



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Empleo de anuros autóctonos como herramienta bioanalítica de respuesta temprana a la exposición de herbicidas utilizados en agroecosistemas pampeanos

Pérez Iglesias, Juan Manuel

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Larramendy, Marcelo L.

Co-dirección: Natale, Guillermo S.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2018

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20180418001577>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

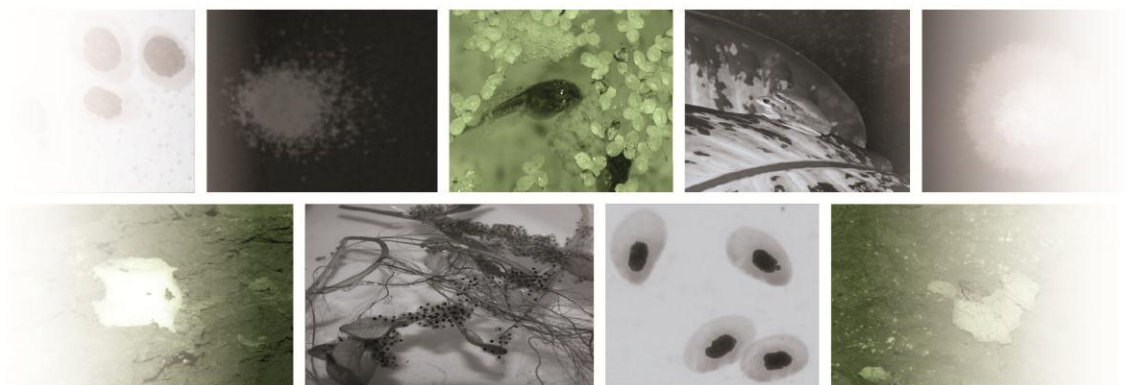
Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PLATA – FACULTAD
DE CIENCIAS NATURALES
Y MUSEO

Trabajo para optar por
el Título de Doctor en Ciencias Naturales

**“EMPLEO DE ANUROS AUTÓCTONOS COMO
HERRAMIENTA BIOANALÍTICA DE RESPUESTA
TEMPRANA A LA EXPOSICIÓN DE HERBICIDAS
UTILIZADOS EN AGROECOSISTEMAS PAMPEANOS”**



LIC. JUAN MANUEL PÉREZ IGLESIAS

Directores de tesis:
Marcelo L. Larramendy y Guillermo S. Natale

2018

DEDICATORIA

A la memoria,
de mi santa y querida abuela Leonor,
que nos acompaña desde la gloria Eterna...

AGRADECIMIENTOS

Al Señor y la Santísima Virgen por los dones y las cruces del camino, en especial la fortaleza para la perseverancia en este largo camino,

A mis padres (Raúl y Delia) y a mis hermanos (José, Mari, Marcos, Agus, Mechi – autora de la carátula –, Gabi, Vicky, Nico y Santi) y sobrino (Manu) por el cariño y la paciencia a la distancia,

A mi esposa, Nadia, por su compañía incondicional, amor, su fuerza, sus risas y paciencia en todo momento, en especial para las dificultades,

A Marcelo y Guillermo, mis directores de tesis doctoral, por las enseñanzas a nivel profesional y personal que dejan impresadas en mi vida,

Al Lelo, Yaya y Leonor, mis abuelos por ser dadores de vida y las enseñanzas de vida constante,

A Toni y Fini, Quique y Adriana, Patri, Laura, Raquel y P. Sergio, mis tíos y tías por sus charlas, alegrías, consejos y oraciones constantemente; a mis primos y cuñados, por las risas, alegrías y momentos de tranquilidad en la cercanía y a la distancia,

A la familia política: Patri, Teo, Iván y Lore, Blado y Pao, Cintia y Daniel, Axel y Marina, Erik por su confianza y palabras de aliento en todo momento, y a los sobrinos por su cariño!

A mis grandes amigos en Cristo: José Miguel, Carlitos, Jona, Juanma, Timo, Leo, Andy, Ema, Francis, Seba, Marian, Dardo, Nica, Maxi, Juan F, Adolfo, José P, Nacho, por ser cables a tierra en el mundo: con la alegría cristiana, las noches de peña, el fútbol y el paddle, las charlas, cenas y mates. Al P. Elbio, P. Eduardo, P. Leonardo, P. Juan de Dios, P. Gabriel y P. Maxi por sus oraciones, consejos y sabias palabras,

A Classius y Lilian por sus consejos, alegría y en especial por su incondicional confianza y apoyo profesional y personal; al Lab. de anatomía de IBILCE-UNESP por su gran y constante ayuda Larinha, Gabi L, Juliane F y a Rodrigo Z y la galera de la Rep. Cristoval Colombo por su amistad y alegría constante.

A toda la Unidad 5-CIMA (ranas), por los momentos compartidos y la pasión por las ranas! A la gente amiga del Lab. de Citología, en especial a Sonia, Celeste y Noelia por el constante ánimo, apoyo y consejos.

A todos los chicos del CIMA por la compañía, en especial a la Dra. Alicia Ronco (Nina) en su memoria por sus consejos, apoyo y ayuda en las dificultades; a Damián Marino, Pablo Demetrio, Pedro Carriquiriborde, Fede Rimoldi y Leticia Peluso por su buena predisposición para resolver cualquier asunto profesional.

A los profesionales del INTA: Julie Brodeur, Jimena Damonte, Belén Poliserpi y Florencia por abrir las puertas de su laboratorio para realizar mis estudios, por su excelente predisposición, calidez humana y profesional, su incansable ayuda y por la paciencia para dejarme sus enseñanzas.

Y un agradecimiento a los jurados de la Tesis Doctoral: las Dras. Ana Ferrari, Marilina Fogel y Gisela Poletta, por su dedicación y tiempo para leer, estudiar y aconsejar desde las correcciones a pesar de la distancia.

A los compañeros, amigos del camino y profesionales que se cruzan en este camino y siempre con la mejor predisposición ofrecen su ayuda: Leandro A, Brian Y, Javier P, Mariano M, Estefanía M y Sandra S.

INDICE

ABREVIATURAS	11
RESUMEN	15
ABSTRACT	19
LISTA DE PUBLICACIONES	23
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	24
1.1 El uso de herbicidas en prácticas agrícolas	25
1.1.1. La “Revolución Verde” en el mundo	25
1.1.2. El nuevo modelo agrícola de plaguicidas en Argentina y la región pampeana	26
1.1.3. Nuevos herbicidas utilizados en prácticas agrícolas: el caso de las imidazolinonas	29
1.1.3.1. Características generales de las imidazolinonas	29
1.1.3.2. Toxicidad de las imidazolinonas	32
1.1.4. Herbicida Imazetapir: características, toxicidad y genotoxicidad	33
1.2. Efectos de los estresores ambientales sobre los ecosistemas	35
1.2.1. Ingreso de los estresores ambientales a los ecosistemas	35
1.2.2. Consecuencias ambientales del uso de plaguicidas en la salud humana y en la biodiversidad	38
1.2.3. Ecotoxicología como nueva ciencia: breve reseña	40
1.3. Los anuros como modelo para la evaluación de estresores ambientales en ecotoxicología	41
1.3.1. Pérdida de la biodiversidad mundial de anuros	41
1.3.2. Evidencias de los efectos de estresores ambientales en anuros	41
1.3.3. Anfibios como indicadores de la calidad ambiental	42
1.3.4. Ecotoxicología de anuros en Argentina: breve reseña y nuevos objetivos	42
1.4. Biomarcadores como herramienta ecotoxicológica	44
1.4.1. Concepto de biomarcadores	44
1.4.2. La importancia de la correlación de biomarcadores en los diferentes niveles de organización	46

1.4.3. Los biomarcadores en especies bioindicadoras como herramientas de diagnóstico ambiental	48
1.4.4. Bioensayos como herramienta para evaluar biomarcadores.....	49
1.4.5. Biomarcadores de uso convencional en ecotoxicología de anfibios	50
1.4.5.1. Biomarcadores a nivel de individuo	51
1.4.5.2. Biomarcadores a nivel histológico.....	53
1.4.5.3. Biomarcadores a nivel bioquímico	55
1.5. Biomarcadores de cito y genotoxicidad.....	56
1.5.1. Generalidades sobre cito y genotoxicidad	56
1.5.2. Importancia de los estudios de cito y genotoxicidad en ecotoxicología	57
1.5.3. Hematología en anfibios para evaluaciones de cito y genotoxicidad	58
1.5.4. Ensayos para evaluar cito y genotoxicidad en anfibios	60
1.5.5. Nuevos objetivos en ecotoxicología y citogenética	64
1.6. Especies seleccionadas como modelo de estudio	66
1.6.1 Especies de estudio	66
1.6.1.1 <i>Boana pulchella</i> como especie de estudio	66
1.6.1.2 <i>Leptodactylus latinasus</i> como especie de estudio	69
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTUDIO	72
2.1 Hipótesis y objetivos de estudio	73
2.1.1 Hipótesis general.....	74
2.1.2 Hipótesis específicas	74
2.1.3. Objetivo general	74
2.1.4. Objetivos específicos	75
2.1.5 Objetivos particulares.....	75
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.1. Sitios de captura de las especies	77

3.1.1. Selección de los sitios de captura de las especies	77
3.1.2. Descripción floro-faunística de los sitios de captura	79
3.2. Métodos de captura y estudio de las especies	81
3.2.1. Métodos de colecta y estudio de <i>Boana pulchella</i>	82
3.2.1.1 Muestreo de huevos, larvas y adultos	82
3.2.1.2 Cría y mantenimiento de huevos, larvas y adultos en laboratorio.....	83
3.2.2. Método de captura y estudios en <i>Leptodactylus latinasus</i>	85
3.2.2.1 Muestreo de huevos, larvas y adultos	85
3.2.2.2 Cría y mantenimiento de huevos, larvas y adultos en laboratorio.....	85
3.3. Materiales empleados para los estudios ecotoxicológicos.....	87
3.4. Metodología empleada para estudios ecotoxicológicos	87
3.4.1 Bioensayos de toxicidad con larvas	87
3.4.1.2 Bioensayo de toxicidad crónico.....	91
3.4.1.3 Bioensayos para evaluar el daño oxidativo en el ADN	93
3.4.1.4 Bioensayos para evaluar las capacidades de recuperación en larvas de <i>Boana pulchella</i>	95
3.4.2 Bioensayos con adultos de <i>Boana pulchella</i> y <i>Leptodactylus latinasus</i>	97
3.5. Puntos finales evaluados	99
3.5.1. Nivel citogenético: MNs, anormalidades nucleares y ensayo cometa.....	99
3.5.1.1 Análisis de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares	99
3.5.1.2 Cuantificación de la inducción de rupturas de cadena simple y daño oxidativo en el ADN mediante el ensayo cometa	100
3.5.2. Nivel bioquímico: Biomarcadores de estrés oxidativo hepático.....	104
3.5.2.1 Determinación de catalasa	105
3.5.2.2 Determinación de glutatión-S-transferasa	105
3.5.2.3 Determinación de acetilcolinesterasa	106

3.5.3 Nivel histológico: implementación como novedosos biomarcadores	106
3.5.3.1 Procesamiento histológico de las muestras de hígado.....	106
3.5.3.2 Detección y cuantificación de la pigmentación en melanomacrofagos hepáticos (MMC)	106
3.5.3.3 Patologías hepáticas.....	108
3.5.4. Nivel individual: efectos letales y subletales	109
3.5.4.1 Puntos finales letales	109
3.5.4.2 Puntos finales subletales de condición corporal	109
3.5.4.4 Puntos finales subletales de anormalidades morfológicas	111
3.6. Análisis estadísticos	112
3.6.1 Análisis para el estudio de parámetros ecotoxicológicos según relación concentración-respuesta.....	112
3.6.2 Análisis de la varianza en los puntos finales con un factor dependiente	112
3.6.3 Análisis empleados para realizar comparaciones entre especies estudiadas	113
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	115
4.1. Aportes a la biología de las especies estudiadas para ser implementadas como modelo de estudio	116
4.1.1. Resultados de muestreos en campo en <i>Boana pulchella</i>	116
4.1.2. Resultados de cría en laboratorio en <i>Boana pulchella</i>	118
4.1.3. Resultados de muestreos a campo de <i>Leptodactylus latinasus</i>	120
4.1.4. Resultados de cría en laboratorio de <i>Leptodactylus latinasus</i>	121
4.2. Análisis de IMZT en bioensayos de toxicidad	123
4.3. Efectos letales y subletales de IMZT en larvas y adultos de <i>Boana pulchella</i>	123
4.3.1 Efectos letales en larvas de <i>Boana pulchella</i>	123
4.3.2. Efectos a nivel citogenético	124
4.3.2.1. Efectos agudos	124
4.3.2.1.1 MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos	124
4.3.2.1.2 Daño en el ADN evaluado por EC	127

4.3.2.2 Efectos crónicos en larvas a nivel citogenético	130
4.3.2.3 Evaluación del daño oxidativo producido por IMZT en larvas	132
4.3.2.4 Evaluación de las capacidades de recuperación al daño producido por IMZT en larvas de <i>Boana pulchella</i> a nivel citogenético	135
4.3.3 Efectos a nivel bioquímico	139
4.3.4 Efectos a nivel histológico en larvas	141
4.3.4.1 Pigmentación de MMCs hepáticos.....	141
4.3.4.2 Patologías hepáticas.....	142
4.3.5. Efectos a nivel de individuo	143
4.3.5.1 Efectos subletales en el comportamiento	143
4.3.5.2 Efectos subletales en el crecimiento y desarrollo e índices de condición corporal.....	143
4.3.5.3 Efectos subletales por presencia de anormalidades morfológicas	145
4.4. Efectos letales y subletales de IMZT en larvas y adultos de <i>Leptodactylus latinasus</i>	147
4.4.1 Efectos letales en larvas	147
4.4.2 Efectos a nivel citogenético	147
4.4.2.1 MNs y anormalidades nucleares.....	147
4.4.2.2 Daño en el ADN detectados por EC	149
4.4.3 Efectos a nivel bioquímico	151
4.4.4. Efectos a nivel histológico en adultos de <i>Leptodactylus latinasus</i>	152
4.4.4.1 Pigmentación de MMCs hepáticos.....	152
4.4.4.2 Patologías hepáticas.....	153
4.4.5. Efectos a nivel de organismo.....	153
4.4.5.1 Efectos subletales en el comportamiento	153
4.4.5.2 Efectos subletales en el crecimiento, desarrollo e índices de condición corporal.....	154
4.4.5.3 Efectos subletales con presencia de anormalidades morfológicas	154

4.5 Correlación de biomarcadores a diferentes niveles.....	155
4.5.1 Correlación de biomarcadores en <i>Boana pulchella</i>	155
4.5.1.1 Análisis multivariado de los biomarcadores en larvas de <i>Boana pulchella</i>	155
4.5.1.2 Análisis multivariado de los biomarcadores en adultos de <i>Boana pulchella</i>	157
4.5.2. Correlación de biomarcadores en <i>Leptodactylus latinasus</i>	159
4.5.2.1 Análisis multivariado de los biomarcadores en larvas de <i>Leptodactylus latinasus</i>	159
4.5.2.2 Análisis multivariado de los biomarcadores en adultos de <i>Leptodactylus latinasus</i>	161
4.6 Comparación de las respuestas entre especies	163
4.6.1 Comparación de la sensibilidad entre las especies modelo utilizadas según los biomarcadores empleados	163
4.6.2 Curva SSD y evaluación de riesgo toxicológico en anuros de ambientes pampeanos.....	164
CAPITULO V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	166
5.1. Discusión	167
5.1.1 Sobre la utilidad de la especie como modelo de estudio	167
5.1.2 Evaluación toxicológica de IMZT en larvas de las especies estudiadas	169
5.1.3. Efectos de IMZT a nivel citogenético en larvas y adultos de las especies estudiadas	171
5.1.3.1 Efectos agudos	171
5.1.3.2 Efectos crónicos en larvas.....	174
5.1.3.3 Evaluación del daño oxidativo en larvas.....	176
5.1.3.4 Recuperación del daño genético.....	177
5.1.4. Interpretación sobre los efectos subletales de IMZT en larvas y adultos de las especies estudiadas	180
5.1.4.1 Sobre los efectos subletales a nivel bioquímico.....	180
5.1.4.1 Sobre los efectos subletales a nivel histológico	183
5.1.4.3 Sobre los efectos subletales a nivel individual	186
5.1.5 Análisis integral de los biomarcadores a distintos niveles biológicos.....	187
5.1.6 Relevancia ecotoxicológica de los estudios realizados.....	188

5.2 Conclusiones	189
5.2.1 Conclusiones generales.....	189
5.2.2 Conclusiones particulares.....	190
5.3 Consideraciones finales	191
Bibliografía	193
ANEXO I – PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	217

ABREVIATURAS

A lo largo de la presente Tesis Doctoral, aquellas abreviaturas correspondientes a Instituciones Internacionales al igual que acrónimos internacionalmente aceptados han sido adoptadas en su idioma original y no por su traducción al español.

χ^2 : Chi-cuadrado

μ : Micrones

μg : Microgramos

μl : Microlitros

μm : Micrómetros

μM : Micromolar

μS : Microsiemens

ABPF: Agarosa bajo punto de fusión

AChE: Acetilcolinesterasa

ATCh: Acetilcolina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

APFN: Agarosa punto de fusión normal

AS: Aumento del tamaño en sinusoides hepáticos

ASIH: *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*

ASTM: *American Society for Testing Materials*

BDS: *Body diamond shape*

BNs: Células binucleadas

CASAFE: Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CAS-RN: *Chemical Abstracts Service Registry Number*

CAT: Catalasa

CDNB: 1-Cloro-2, 4-dinitrobenzeno

CHO: Células de ovario de hámster chino

CL50: Concentración letal 50

CINa: Cloruro de sodio

cm³: Centímetros cúbicos

CP: Ciclofosfamida

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DTNB: 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Daño oxidativo

DS: Desvío estándar

EC: Ensayo cometa

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

EndoIII: Endonucleasa III

ES: Error estándar

EPs: Eritroplástidos

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FeCl₃: Cloruro férrico

Fpg: Formamido-pirimidina ADN-glicosilasa

GM: Genéticamente modificadas/modificados

g: Gramo

GS: Estadio de desarrollo larval según Gosner

GST: Glutación-S-transferasa

H₂O₂: Agua oxigenada

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno

ha: Hectárea

HC: *Hazardous Concentration*

HCl: Ácido clorhídrico

HE: Hematoxilina-eosina

HNs: Hendiduras nucleares

HV: Hipervascularización

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ICG: Índice de cuerpos grasos

IDG: Índice de daño genético

IG: Índice gonadosomático

IHS: Índice hepatosomático

IM: Inmovilidad

IMZT: Imazetapir

IS: Natación irregular

IUCN: *International Union for Conservation of Nature*

K: Índice condición corporal

$K_2Cr_2O_7$: Dicromato de potasio

$K_4[Fe(CN)_6]$: Ferrocianuro de potasio

l: Litro

LHC: Longitud hocico-cloaca

LOEC: *Lowest Observed Effect Concentration*

mA: Miliamperios

mg: Miligramos

ml: Mililitros

mm: Milímetros

MMC: Melanomacrófagos

MNs: Micronúcleos

msnm: Metros sobre el nivel del mar

Na_2EDTA : Ácido etilen-diamino-tetraacético di-sódico

NaOH: Hidróxido de sodio

NaOCl: Hipoclorito de sodio

NLs: Núcleos lobulados

nm: Nanómetros

NOEC: *No Observed Effect Concentration*

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

p.a.: Principio activo

PBS: Buffer fosfato salino

PC: *Principal component o factor*

PCA: *Principal component analysis*

rpm: Revoluciones por minuto

SCGE: *Single Cell Gel Electrophoresis*

SSD: Distribución de Sensibilidad de Especies

tn: Toneladas

U.S. EPA: *The United States Environmental Protection Agency*

UV: Ultravioleta

V: Vacuolización de hepatocitos

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral fue evaluar efectos a nivel bioquímico y citogenético inducidos por un nuevo herbicida imazetapir (IMZT) en larvas y adultos de anuros autóctonos, *Boana pulchella* y *Leptodactylus latinasus*, asociados a efectos histológicos e individuales, para su posterior incorporación como herramienta bioanalítica de respuesta temprana en programas de monitoreo y diagnóstico ambiental. El uso intensivo de plaguicidas del modelo agrícola actual es una preocupación para la salud humana y además es propuesto como uno de los factores responsables de la pérdida mundial de la biodiversidad. En particular, las plagas han desarrollado tolerancia a estos agroquímicos y en consecuencia se ha llevado a cabo el desarrollo y la aplicación de nuevos herbicidas. En este contexto, se han desarrollado y comercializado nuevos cultivos tolerantes a herbicidas como sucede en el caso de los cultivos resistentes al sistema de producción Clearfield®. IMZT es un herbicida selectivo post-emergente con acción residual miembro de las imidazolinonas utilizado para el control de gramíneas y malezas de hoja ancha en una amplia variedad de cultivos pampeanos. Actualmente, este herbicida ha sido clasificado como compuesto levemente tóxico (Clase III) según la USEPA y la información actual sobre sus efectos ecotoxicológicos en organismos acuáticos es escasa. Por otro lado, la aplicación de herbicidas ha sido propuesta como una de las principales causas que influyen en la disminución de anfibios a nivel mundial. En este sentido, los ecotoxicólogos han buscado diferentes herramientas como los biomarcadores que permitan detectar daños antes que éstos sean irreversibles en los organismos expuestos a plaguicidas. Se conoce que el uso de biomarcadores a nivel citogenético permite detectar respuestas tempranas en anfibios expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de herbicidas. En ese contexto, estos biomarcadores no sólo son recomendados para evaluar la salud de las poblaciones de anfibios sino que además son aceptados como indicadores de la calidad ambiental. Actualmente, existe un consenso en ecotoxicología sobre la necesidad de utilizar biomarcadores específicos a diferentes niveles de organización biológica y generar nuevos biomarcadores con el fin de resolver problemáticas ambientales actuales utilizando especies claves y representativas de ecosistemas perturbados.

Con el fin de evaluar la toxicidad del herbicida IMZT y poner a prueba distintos puntos finales en larvas y adultos de *B. pulchella* y *L. latinasus*, se llevaron a cabo diferentes tipos de bioensayos utilizando el formulado comercial Pivot® H (10,59 g en 100 mL de IMZT) en condiciones controladas de laboratorio (según protocolos estandarizados y propuestos para especies locales) que consistieron en exponer de forma aguda tanto a larvas en diferentes estadios como adultos a posibles escenarios de riesgo para evaluar la respuesta temprana de todos los puntos finales y la potencialidad de IMZT como herbicida emergente. Además, se llevaron a cabo exposiciones crónicas en larvas de *B. pulchella* estadio 25 (Gosner) para evaluar la utilidad de los biomarcadores citogenéticos como herramientas de detección temprana, exposiciones para evaluar la capacidad de resiliencia de larvas de *B. pulchella* estadio 36 (Gosner) luego de una exposición aguda y exposición aguda *in vivo* y *ex vivo* para evaluar el tipo de daño que el herbicida induce en el ADN

mediante técnicas citogenéticas específicas como el ensayo cometa modificado. Específicamente, se investigaron los efectos letales y subletales ejercidos por el herbicida IMZT. Para evaluar los efectos letales se calcularon parámetros toxicológicos correspondientes a los valores de la CL50, las curvas de concentración respuesta y los valores LOEC-NOEC. En el caso de los efectos subletales se emplearon puntos finales a diferentes niveles de organización biológica tales como nivel citogenético (micronúcleos – MNs –, anormalidades nucleares y ensayo cometa – EC –), bioquímico (enzimas antioxidantes – CAT y GST – y del sistema colinérgico – AChE –), histológico (histopatología y melanomacrófagos – MMC –) e individual (comportamiento, desarrollo, crecimiento y anormalidades morfológicas). Las respuestas de los puntos finales a IMZT fueron analizados por medio de estadística probabilística utilizando *t-test*, ANOVA de una vía con test a posterior de Dunnett y ANOVA dos vías, según correspondiera. Con el fin de correlacionar e integrar la respuesta de los biomarcadores en cada especie estudiada se realizaron análisis estadísticos multivariados descriptivos que ayudan a comprender de mejor manera el modo de acción del herbicida en diferentes escenarios de exposición tanto en larvas como en adultos de ambas especies. Finalmente, se obtuvo la curva de sensibilidad de especies y se realizaron estimaciones de sensibilidad a IMZT entre las diferentes especies pampeanas con el objetivo de alcanzar un mayor conocimiento sobre la toxicidad del herbicida en anuros locales.

Los resultados de la exposición aguda demostraron que IMZT produce efectos letales con valores de $CL50_{96h} = 1,48$ mg/l de IMZT para larvas de *B. pulchella* en ambos estadios de desarrollo y valores de $CL50_{96h} = 1,01$ y $0,29$ mg/l de IMZT para larvas de *L. latinasus* en estadios de desarrollo 25 y 36 (Gosner), respectivamente. Sumado a esto, se evidenció que otras 7 especies pampeanas en estadio 25 (Gosner) presentan valores de $CL50_{96h}$ entre $0,50$ y $1,16$ mg/l y esto permitió estimar un valor de concentración peligrosa para especies pampeanas equivalente a $0,53$ mg/l de IMZT. Los resultados de los efectos subletales en larvas y adultos de los bioensayos demostraron que todos los biomarcadores utilizados mostraron respuestas por la exposición a IMZT. En particular, para ambas especies en larvas y adultos se evidenciaron efectos citogenotóxicos por la exposición aguda a IMZT en concentraciones subletales y dichos efectos fueron detectados por el aumento en la frecuencia de MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos y aumentos en la frecuencia del daño en el ADN evidenciada en los nucleoides de células sanguíneas. Por otro lado, se constató que las técnicas citogenéticas aplicadas son útiles para ensayos crónicos ya que responden a bajas concentraciones de exposición del herbicida y dichos efectos se detectan antes que se produzcan efectos más severos a nivel individual tal como el retraso en la metamorfosis que se produce a $0,19$ mg/l de IMZT. Sumado a esto, a partir de los bioensayos de recuperación se observaron que los daños citogenéticos observados en larvas de *B. pulchella* a una concentración subletal de $0,39$ mg/l de IMZT retornan a niveles basales de daño genético iguales al grupo control luego de 7 días en agua sin herbicida aunque persistan los efectos a nivel individual tales como anormalidades morfológicas y retraso en el estadio de desarrollo. Por último, con los bioensayos citogenéticos para evaluar el tipo de daño en el ADN que produce el herbicida, se detectó que IMZT a

concentraciones subletales induce daño oxidativo en bases púricas de larvas de *B. pulchella*. Además de esto, se constató que IMZT induce alteraciones en el sistema enzimático antioxidante de larvas y adultos de ambas especies. En particular, se observó que IMZT altera significativamente la actividad de CAT, GST y AChE en larvas y adultos de *B. pulchella* a diferentes tiempos de exposición evaluados; mientras que en *L. latinasus* se observó que sólo GST sufre alteraciones por la exposición a IMZT en larvas pero en adultos se ven afectadas CAT, GST y AChE en diferentes tiempos de exposición evaluados. Los análisis histológicos revelaron aumentos en la frecuencia de MMC por área de hígado en larvas de *B. pulchella* luego de la exposición aguda a IMZT en un intervalo de concentraciones entre 0,40 y 1,22 mg/l y además se observó la presencia de hígados hipervascularizados en larvas de esta especie expuestas a elevadas concentraciones de IMZT que variaban entre 1,36 y 1,49 mg/l. Sumado a esto, en adultos de *L. latinasus*, los resultados demostraron que en diferentes tiempos de evaluación el herbicida IMZT es capaz de inducir alteraciones en el área ocupada por los pigmentos melanina, hemosiderina y lipofuscina de los MMC hepáticos así como también es capaz de provocar lesiones en el hígado tales como hipervascularización y aumentos de los sinusoides hepáticos cuando estas ranas son expuestas a IMZT en posibles escenarios reales de exposición. Finalmente, los estudios de las evaluaciones subletales de los puntos finales demostraron que IMZT en las mayores concentraciones ensayadas produce efectos a nivel individual relacionados con la pérdida de queratodotes en larvas de ambas especies y anomalías en el cuerpo de larvas de *L. latinasus*, a su vez produce alteraciones en el comportamiento natatorio de ambas especies a tiempos cortos de exposición y efectos en la condición corporal de adultos de ambas especies por disminución del índice de condición corporal en *B. pulchella* y disminución del índice hepatosomático en *L. latinasus* cuando ambas especies son expuestas a probables escenarios reales. El análisis multivariado descriptivo permitió corroborar que los biomarcadores evaluados en un mismo nivel de organización biológica están altamente correlacionados y a su vez demostró que existe una progresión de efectos menos severos (detectados a niveles citogenéticos-bioquímicos) a más severos (detectados a niveles histológicos-individuales) conforme aumenta la concentración de IMZT.

Los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral representan una evidencia concreta de que IMZT produce efectos letales y subletales a diferentes niveles de organización en larvas y adultos de especies pampeanas. Además demuestran que el herbicida es un agente oxidativo con capacidad genotóxica, citotóxica y hepatotóxica para anuros y debería ser clasificado según los valores de CL50_{96h} como compuesto tóxico (Categoría II) a muy tóxico (Categoría I), al menos para las especies de anuro pampeanas. Además, se considera que las especies son buenos modelos no sólo para estudios ecotoxicológicos sino también como potenciales bioindicadoras para estudios en ambientes perturbados. Finalmente, se destaca de manera particular que los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos empleados en este trabajo a diferentes niveles de organización y de manera integral pueden ser considerados como herramientas válidas de alerta temprana que

permitan realizar predicciones sobre efectos letales y subletales irreversibles en futuros estudios ecotoxicológicos así como también en programas de evaluación y monitoreo ambiental en sitios perturbados o con eventos de contaminación.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the cytogenetic and biochemical effects of a novel herbicide imazetapir (IMZT) induced in tadpoles and adults of local anurans—such as *Boana pulchella* and *Leptodactylus latinasus*—and to associate those alterations with histologic and corporal changes for later implementation as an early-response bioanalytical tool in environmental-monitoring and diagnostic programs. The intensive use of pesticides in the current agricultural system is a concern for human health and has been proposed as one of the influences responsible for the global loss of biodiversity. In particular, the tolerance pests have developed to those agrochemicals has prompted the development and application of new herbicides. Within this scenario, new herbicide-tolerant crops have accordingly been developed and marketed, as in the example of resistance to the imidazolinones in the Clearfield® production system. IMZT is a post-emergent selective herbicide with the residual action of the imidazolinones used for the control of broadleaf grasses and weeds in a wide variety of pampas crops. Currently, this herbicide has been classified as a slightly toxic compound (Class III) according to United States Environmental Protection Agency (USEPA), and the current information about the compound's ecotoxicologic profile on aquatic organisms is scarce. In addition, the application of herbicides has been proposed as one of the main influential causes of the amphibian decline worldwide. Therefore, ecotoxicologists have been searching for better biomarkers that for their part would allow the detection of damages within the different biologic organizational levels after the exposure to environmental stressors before such alterations become irreversible. In particular, the use of cytogenetic biomarkers in ecotoxicological studies can detect early responses in amphibians exposed to environmentally relevant concentrations of herbicides before the damage becomes too irreversible. Accordingly, those biomarkers are not only recommended for assessing the health of amphibian populations but also have been accepted as indicators of environmental quality. A current consensus on ecotoxicology has been reached regarding the need to use specific biomarkers at different levels of biologic organization and to generate new biomarkers in order to solve current environmental problems through the use of key and representative species within disturbed ecosystems.

In view of these considerations, in order to evaluate the toxicity of the IMZT herbicide and to test several endpoints at different biological levels in tadpoles and adults of *B. pulchella* and *L. latinasus*, I carried out different types of bioassays using the commercial formulation Pivot® H under controlled laboratory conditions (according to standardized protocols along with other procedures proposed for local species) that consisted in bioassays involving acute exposures to the formulation of tadpoles at different stages as well as adults in three possible risk scenarios to evaluate the early response of all the endpoints and the potential toxicity of IMZT as an emergent herbicide. In addition, I performed a chronic bioassay in *B. pulchella* tadpoles at (Gosner) Stage 25 to evaluate the utility of cytogenetic biomarkers as tools for early detection in addition to a bioassay to evaluate the resilience in *B. pulchella* tadpoles at (Gosner) Stage 36 after an acute exposure.

Finally, I conducted acute bioassays in vivo and ex vivo in order to assess the type of damage the herbicide induces in the DNA by specific cytogenetic techniques such as a modified comet assay.

As a determination of the specific outcome at all levels of the organism, I investigated the lethal and sublethal effects exerted by the IMZT herbicide. To assess lethal effects, I calculated the relevant toxicological parameters such as the LC50 values, the dose-response curves, and the no-observed-effect (NOEC) and lowest-observed-effect (LOEC) concentrations. For determining the sublethal effects, the endpoints chosen were at the different levels of biologic organization—namely, the cytogenetic (i. e., micronucleus formation [MNs], nuclear abnormalities, and the comet assay [EC]), the biochemical (i. e., the antioxidant enzymes catalase [CAT] and glutathione-S-transferase [GST] and the cholinergic enzyme acetylcholinesterase [AChE]), the histologic (histopathology and the presence of melanomacrophages [MMC]), and the corporal (i. e., behavior, development, growth, and morphologic abnormalities).

These endpoint responses to IMZT were analyzed by means of probabilistic statistics such as the Student t test, the one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's ex-post-hoc test, and the two-way ANOVA, as appropriate. In order to correlate and integrate the biomarker responses in each species studied, descriptive multivariate statistical analyses were performed to help clarify the mode of action of the herbicide in tadpoles and adults of both species under the different exposure scenarios. Finally, the sensitivity curve of the species was obtained and estimations of sensitivity to IMZT made between the two different pampas species in order to gain a more complete understanding of the herbicide toxicity in local anurans.

The results of acute exposures demonstrated that the Pivot® H IMZT-based formulation produced lethality at an LC50_{96h} value of 1.48 mg/l of IMZT for *B. pulchella* tadpoles at both stages (25 and 36) of development and LC50_{96h} values of 1.01 and 0.29 mg/l of IMZT on *L. latinasus* tadpoles at (Gosner) stages 25 and 36, respectively. In addition, the commercial product was lethal to 7 other Pampean species at (Gosner) stage 25 at a range of LC50_{96h} values between 0.50 and 1.16 mg/l, thus pointing to the conclusion that the equivalent of 0.53 mg/l of IMZT is a dangerous concentration of the product for Pampean anuran species.

The results of the sublethal effects on larvae and adults in the bioassays indicated that all the biomarkers used were altered by IMZT exposure. In particular, the tadpoles as well as adults of both species, exhibited alterations in cytogenetic parameters after an acute exposure to IMZT at sublethal concentrations and those changes were detected as an increase in the frequency of MNs and nuclear abnormalities in erythrocytes along with increments in the frequency of DNA damage as evidenced by the EC on the nucleoids of blood cells. Moreover, the cytogenetic techniques applied proved to be useful for chronic trials as those methods reveal responses after short herbicide-exposure times before more severe effects occur at the corporal level, such as the delay in metamorphosis produced at 0.19 mg/l of IMZT.

In addition, from the recovery bioassays, the cytogenetic damage observed in *B. pulchella* tadpoles at a sublethal concentration of 0.39 mg/l of IMZT was found to return to baseline levels equal to those of the control group after 7 days in water in the absence of herbicide although the effects at corporal level—such as morphologic abnormalities and a delay in reaching developmental stages—persisted.

Finally, cytogenetic bioassays to assess the type of nucleotide damage revealed that IMZT at sublethal concentrations induced oxidative changes in the purine bases of the *B. pulchella*–tadpole DNA. Furthermore, IMZT induced alterations in the enzymatic antioxidant system of both tadpoles or adults of both species. In particular, IMZT significantly altered CAT, GST, and AChE activities in *B. pulchella* tadpoles and adults after the different times of exposure evaluated. In contrast, in the tadpoles of *L. latinasus*, only the GST underwent alterations after exposure to IMZT; whereas, in the adults, the activity of all three enzymes was affected after those different exposure times.

Histological analyses revealed increases in the frequency of melanomacrophages (MMC) per unit area of liver in *B. pulchella* tadpoles after acute exposure to IMZT in a concentration range between 0.40 and 1.22 mg/l; moreover, the presence of liver pathologies such as hypervascularization was observed at higher IMZT concentrations ranging from 1.36 to 1.49 mg/l. In addition, in the adults of *L. latinasus*, IMZT induced alterations in the area occupied by the pigments melanin, hemosiderin, and lipofuscin in the hepatic MMCs and was capable of causing liver injury, such as a hypervascularization and an increase in hepatic sinusoids, when those frogs were exposed to IMZT in simulated possible real exposure scenarios.

Studies of the sublethal-endpoint evaluations demonstrated that at high concentrations IMZT produced corporal effects related to the loss of keratodonts in tadpoles of both species and abnormalities in the body of *L. latinasus* tadpoles. IMZT exposure also resulted in alterations in the swimming ability of both species after short times of exposure and could adversely affect the corporal status in the adults of both species as evidenced by a decrease in the body-condition index in *B. pulchella* and a reduction in the hepatosomatic index in *L. latinasus* when either species was exposed to concentrations of the product likely encountered under real circumstances in the field.

Finally, the multivariate descriptive analysis corroborated that the biomarkers evaluated at the same level of biologic organization were highly correlated and in turn indicated a progression of less severe (detected at cytogenetic-biochemical levels) to more severe (detected at histological-corporal levels) as the IMZT concentration increased.

The results obtained from this Doctoral Thesis represent concrete evidence that IMZT produces lethal and sublethal effects at different levels of biologic organization in tadpoles and adults of local anuran species such as *B. pulchella* and *L. latinasus*. In addition, the findings demonstrated that the herbicide is an oxidative agent with genotoxic, cytotoxic, and hepatotoxic consequences in the two species studied and, according to the LC50_{96h} values obtained, should be classified anywhere from a Category-II toxic compound to Category-I very toxic one, at least for pampean anuran

species. Moreover, the two species studied can be considered good models not only for ecotoxicological studies but also as potential bioindicators for investigations in disturbed environments. Finally, I need to stress that the biochemical and cytogenetic biomarkers used in this work at different levels of biologic organization and in a comprehensive analysis could serve as reliable early-warning indicators to allow predictions of lethal and irreversible sublethal effects for use in future ecotoxicological studies as well as in environmental-assessment and monitoring programs in disturbed or contaminated sites.

LISTA DE PUBLICACIONES

Los resultados del presente trabajo de Tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos. Los mismos se encuentran contenidos en el Anexo I.

Trabajos publicados:

1. **J.M. Pérez-Iglesias**, S. Soloneski, N. Nikoloff, G.S. Natale, M.L. Larramendy. 2015. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot® H on Montevideo treefrog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 15–24.
2. **Juan Manuel Pérez-Iglesias**, Celeste Ruiz de Arcaute, Guillermo S. Natale, S. Soloneski, Marcelo L. Larramendy. 2017. Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline EndoIII- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 503–508.
3. **Juan Manuel Pérez-Iglesias**, Guillermo S. Natale, Sonia Soloneski, Marcelo L. Larramendy. 2018. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 1–10.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

“ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DE LA PROBLEMÁTICA”

*“Lo que se transfiere del Norte a Sur no es solo capital y tecnología sino también un conjunto de costos sociales y ambientales”
(James O’Connor - Desarrollo desigual y combinado y crisis ecológica)*

1.1 El uso de herbicidas en prácticas agrícolas

1.1.1. La “Revolución Verde” en el mundo

La FAO (*Food and Agriculture Organization* de la ONU) y el Banco Mundial frente al crecimiento demográfico estimado y con el aumento de consumo de alimentos per cápita, plantearon la necesidad de incrementar la producción de alimentos. De esta manera, surgen nuevos programas alimentarios a nivel nacional e internacional tendientes a mejorar la alimentación de la población mundial, por lo cual el interés por el desarrollo agrícola creció con gran optimismo luego de la segunda guerra mundial (Dahlberg 2012).

Según Dahlberg (2012), la ONU buscaba prevenir el estallido de guerras futuras y ayudar a los países más pobres a desarrollarse. El efecto neto de estos factores fue situar la investigación y los proyectos agrícolas en una posición complementaria al trabajo realizado principalmente por la FAO y el Banco Mundial en los diversos programas de ayuda alimentaria (Dahlberg 2012, Pingali 2012). En este contexto, se consideró necesario generar un nuevo modelo de agricultura con estrategias más eficaces para reducir el hambre y promover la sostenibilidad tanto en los países empobrecidos por las guerras mundiales como en los países en desarrollo. A su vez, la innovación tecnológica aparece como una posible solución a estas demandas que plantean la necesidad de producir más alimentos en cada vez menos superficie agrícola (Shiva 1993). En este contexto histórico se desarrolló la llamada *revolución verde*, un nuevo tipo de agricultura moderna caracterizada por el uso de semillas genéticamente modificadas (GM), algunas con resistencia a los agroquímicos.

Fue en ese marco que comenzaron a llegar algunos de los adelantos tecnológicos impulsados por la llamada *revolución verde*, de los cuales los principales son el uso de nuevas variedades más productivas modificadas genéticamente y la aplicación de agroquímicos (Shiva 1993, Dahlberg 2012). Según Pingali (2012), es posible distinguir dos periodos de la nueva agricultura: el primero, concentrado durante 1960-1985 denominado *revolución verde*, y un segundo período post revolución verde, perteneciente a las últimas tres décadas. Específicamente, las grandes inversiones públicas de la *revolución verde* realizadas en países desarrollados fueron para la mejora genética de los cultivos de primera necesidad como trigo, arroz y maíz construida sobre los avances científicos, y las cuales se adaptaron fácilmente a las condiciones de los países en desarrollo (Pingali 2012). En 1980, y de manera más intensa en la última década, se produjeron una serie de cambios que alteraron la dinámica de la producción agrícola dejando lugar a un nuevo modelo agrícola (Bisang 2004). En pocas palabras, el modelo de agricultura moderna propone cambios estructurales y funcionales fundamentales en los cultivos entre los cuales cabe mencionar 1- el aumento de la intensidad de laboreo del suelo, 2- el

incremento en el uso de plaguicidas, 3- el manejo diferente de los residuos de cosecha y 4- la eliminación de la flora nativa existente (Ghersa y Martinez -Ghersa 1991, Ghersa y Martinez-Ghersa 2000). A este modelo productivo de la agricultura se le sumaron los nuevos logros en ingeniería genética representados principalmente por el uso de plaguicidas sintéticos para el control de diversas plagas y la producción de semillas genéticamente modificadas o GM tolerantes a dichos plaguicidas (Brechelt 2004, Morales y Schaper 2004).

Los avances mencionados de la *revolución verde* han dejado un precio a pagar que incluye el destino de grandes cantidades de contaminantes en los distintos compartimentos de la biósfera (agua, suelo, aire y biota), la liberación de gases de efecto invernadero, la pérdida de diversidad genética de cultivos, la eutrofización de ríos, arroyos, lagos y ecosistemas marinos costeros (contaminación por nutrientes orgánicos e inorgánicos que causan agotamiento de oxígeno) y cambios en la estructura de las redes alimentarias acuáticas. Sumado a esto, otros posibles efectos adversos en el medioambiente producto de la agricultura de alta intensidad, están relacionados con la pérdida de fertilidad y de la erosión del suelo, la mayor incidencia de las enfermedades de los cultivos y del ganado, y los altos insumos energéticos y químicos asociados. En este contexto, las soluciones actuales para evitar los impactos sobre el medio ambiente, se focalizan en realizar prácticas agrícolas alternativas (ej. agro-ecología) que puedan proporcionar rendimientos sostenibles y son preferibles comparados con los de la agricultura de alta intensidad al producir menos costos ambientales (Tilman 1998, Donald 2004, Kareiva y col. 2007). De cualquier manera, la tendencia indica que hay un aumento en el desarrollo de prácticas agrícolas modernas a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo como Sudamérica (Torres y Capote 2004). Particularmente, los países sudamericanos utilizan el 75% de la producción mundial de plaguicidas asociados a las prácticas agrícolas debido a que la productividad del modelo agrícola actual está limitado por la aparición frecuente de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, por lo que el uso de los plaguicidas o agroquímicos se ha convertido en un área prioritaria en respuesta a las demandas del mercado consumidor (Torres y Capote 2004). Por ejemplo, desde 1960 la tasa mundial de aplicación de fertilizantes nitrogenados por la agricultura ha aumentado siete veces y ahora supera las 7×10^7 tn de nitrógeno al año. Cabe destacar que la mitad a dos tercios de los fertilizantes nitrogenados ingresan en ecosistemas no agrícolas; estos ingresos de nitrógeno por las prácticas agrícolas, superan el ingreso de nitrógeno por su ciclo natural y dicha situación está afectando seriamente los ecosistemas terrestres, dulceacuícolas y marinos (Tilman 1998).

1.1.2. El nuevo modelo agrícola de plaguicidas en Argentina y la región pampeana

En muchas regiones latinoamericanas, la llegada de la revolución verde en las primeras décadas del siglo XX profundiza el uso de semillas GM. En este sentido, el agricultor local debe comprar semillas todos los años para asegurar

su cosecha, trasladando parte de la renta a las manos de las compañías, dueñas del manejo del material genético y sus cruzamientos (Pengue 2005). La capitalización de la agricultura en Sudamérica bajo el emblema de la revolución verde, significaría que los agricultores escogen las mejores semillas, las plantan uniformemente en un área lo más grande posible y les aplican agroquímicos. La reducción de la agricultura a esta simple fórmula, deja un pasivo ambiental en esas áreas donde se desarrolla la agricultura intensiva, mientras las grandes compañías de semillas comienzan a acumular un creciente imperio económico y el manejo de la agricultura mundial. Esa agricultura reduccionista hace de los fertilizantes y plaguicidas productos indispensables para protegerse de su propia vulnerabilidad (Pengue 2005).

Particularmente en Argentina, hasta fines de la década de 1980 la producción agropecuaria, sobre todo la que se desarrollaba en la región pampeana, estaba basada en los cultivos clásicos (maíz, trigo, girasol, entre otros) y la producción de carne vacuna con algunos avances de tipo tecnológico, concentrados más en las tareas que en los rendimientos: por ejemplo, la cosecha se había mecanizado, pero casi no se utilizaban fertilizantes (Obschatko 1988, Reboratti 2010). A partir de la década del 1990 hasta 2006, se registró un aumento de la superficie total cultivada en Argentina de aproximadamente el 45%, en coincidencia con la gran expansión del cultivo de soja que fue reemplazando al trigo como cultivo dominante (Aizen y col. 2009, Leguizamón 2014). En este lapso, para el manejo de varios cultivos como maíz (47%), girasol (12%), soja (16%), algodón (8%), trigo (2%), la papa (2%), la alfalfa (3%) y el arroz (6%), el uso de agroquímicos era la solución contra las plagas que disminuían la producción de esos cultivos. Específicamente, los cultivos más utilizados en la región pampeana fueron aquellos GM desarrollados con tolerancia a herbicidas (34%), resistencia a insectos (40%) y a hongos (6%), y tolerancia a virus (2%) (Joensen et al., 2005).

El modelo agrícola moderno fue desarrollado, fundamentalmente, por grandes empresas multinacionales con filiales en los principales países productores, proveedoras del paquete tecnológico, es decir de las semillas GM (resistentes a plaguicidas) y de los insumos necesarios para el cultivo (plaguicidas y fertilizantes) (Reboratti 2010). Particularmente, la soja GM o soja transgénica en Argentina fue adoptada como parte de la estrategia neoliberal de agro-exportación para el desarrollo socio-económico (Leguizamón 2014). El agro-industrialismo y el neoliberalismo han estado vinculados en Argentina, y desde 1996 que se introdujo la soja transgénica, la producción sojera en nuestro país ha aumentado tanto que en los últimos años se convirtió en el tercer productor y exportador mundial de soja (después de Estados Unidos y Brasil), siendo todos ellos cultivos GM (James 2011, Leguizamón 2014). Específicamente, el cultivo de soja GM se siguió expandiendo en los últimos años debido a varias causas como los altos precios internacionales y la demanda creciente de aceite soja y sus derivados, como el grano para alimento del ganado y la harina de soja por parte de algunos países europeos y asiáticos, sumado a la reciente aparición de un mercado para los biocombustibles que afianzó aún más el precio de la soja; todo esto en detrimento de otras actividades pecuarias históricas de la región como la ganadería

(Reboratti 2010). Para Leguizamón (2014), este modelo sojero basado en la producción mecanizada a gran escala de soja transgénica, es ampliamente elogiado tanto en el país como en el extranjero y se utiliza como ejemplo de éxito para alentar a que otros países en desarrollo adopten tecnologías de cultivos GM como medio de impulsar el desarrollo socio-económico. Reboratti (2010) destaca que los productores argentinos eligieron esta tecnología rápidamente y en pocos años casi el 90% de la soja que se cultivaba era a partir de semillas GM constituyendo el porcentaje más alto de adopción en todo el mundo. En este sentido, el uso de cultivos GM llevó a incrementar el consumo de agroquímicos en general y de herbicidas en particular. Según Pengue (2005), este aumento en el consumo se debe por un lado, al incremento del área sembrada, pero también al aumento de la tolerancia o resistencia a herbicidas por parte de las malezas, situación que obligaría de por sí a incrementar la dosis para sostener el control.

La principal región de cultivo de soja en Argentina es la eco-región pampeana (Cabrera y Willink 1973), allí los ecosistemas han sufrido severos disturbios estructurales y funcionales en los últimos 30 años. Particularmente en esta región, la rápida expansión agrícola tuvo lugar a finales de 1990 y en las primeras décadas del siglo XXI, cuando el área de tierra arada para cultivos anuales cubría más de 10 millones de ha. Brevemente para recordar, en el año 1960 el maíz dominaba los sistemas de humedales pampeanos y en grandes áreas era un monocultivo (Bindraban y col. 2009). A mediados de la década del 70, la introducción del cultivo de soja en la región pampeana marca un cambio en los modelos de uso agropecuario adoptados hasta entonces (Ghersa y Ghersa 1991). De este modo, la expansión agrícola alcanza a zonas periféricas de la eco-región pampeana, las cuales eran consideradas tierras marginales dedicadas mayormente a la ganadería extensiva sobre pastizales naturales (Figura 1) (Bindraban y col 2009, Satorre 2005). De esta manera, la extensión de este cultivo ha situado a la soja como el cultivo GM más sembrado de Argentina (16 millones de hectáreas de las cuales 13 corresponden aproximadamente a las provincias que integran la eco-región pampeana), y a la siembra directa como el sistema de manejo dominante en esta eco-región (Bindraban y col. 2009).

En definitiva, este modelo de agricultura intensiva basado en los organismos GM que desde sus comienzos y actualmente se está aplicando en países tales como Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay; no cuenta con una evaluación crítica, ni con regulaciones estrictas, ni con adecuada información disponible que permita conocer y mitigar los impactos de estas prácticas tan extendidas en los países que lo utilizan (López y col. 2012). Todas estas deficiencias, sumado al uso de plaguicidas, la deforestación y fragmentación de hábitats naturales producidas por el modelo agrícola actual, conllevan a una situación de alerta por el posible impacto negativo en la salud de la población humana, del medio ambiente, y en especial en los seres vivos que allí habitan y no son el objetivo de los agroquímicos (López y col. 2012).

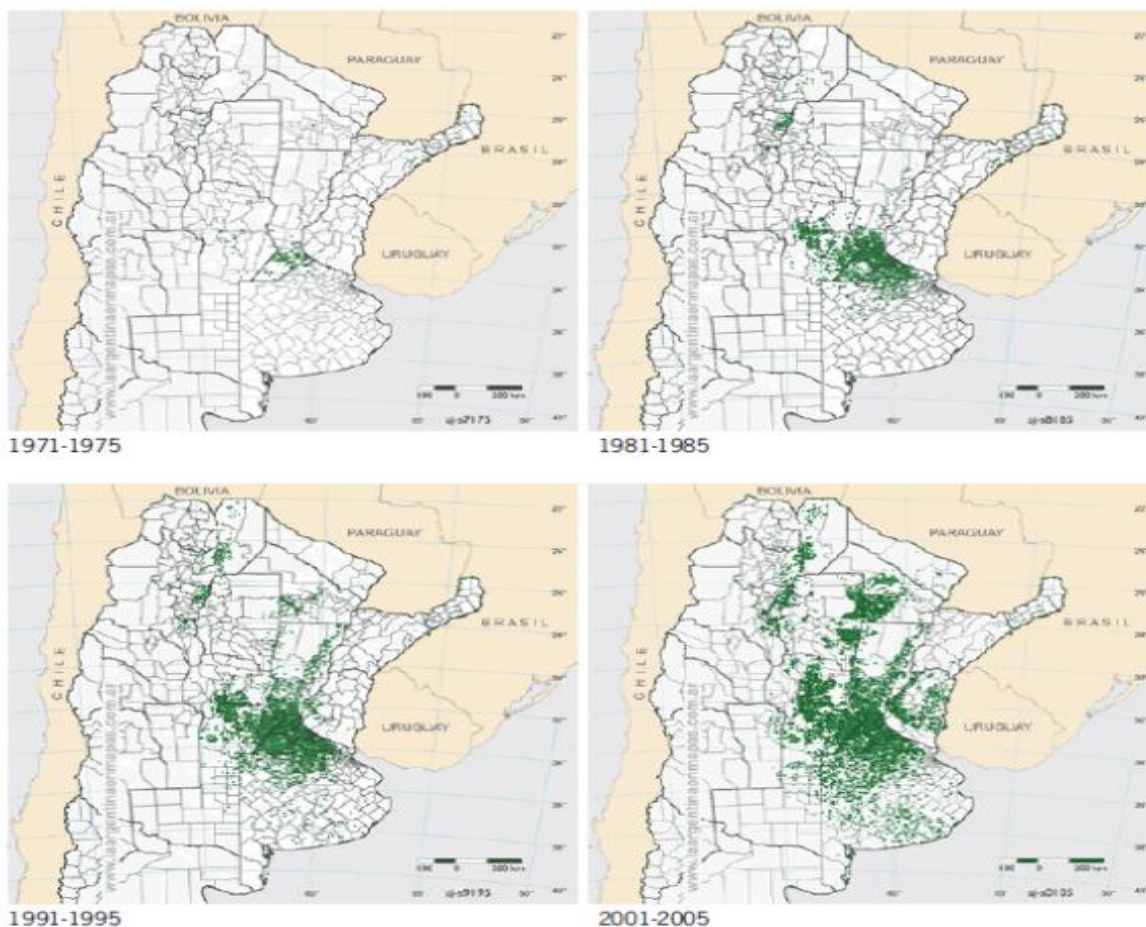


Figura 1. Expansión sojera sobre la eco-región Pampeana y Argentina en los últimos 40 años. Modificado de Bindraban y col. (2009).

1.1.3. Nuevos herbicidas utilizados en prácticas agrícolas: el caso de las imidazolinonas

1.1.3.1. Características generales de las imidazolinonas

Es importante señalar que dentro de los diferentes tipos de contaminantes ambientales podemos destacar dos grandes grupos denominados contaminantes inorgánicos y orgánicos provenientes de diversas fuentes (industriales, mineras, agrícolas, etc.). Los contaminantes inorgánicos son compuestos a base de minerales como metales, nitratos y amianto, y son tóxicos liberados al ambiente de forma intencional y no intencional. Algunos son liberados para un propósito muy específico (por ejemplo, el arseniato de sodio como plaguicida), pero otros son liberados por una amplia gama de actividades humanas tales como el plomo usado en baterías, plomería, aditivos de gas y muchos otros productos. Los contaminantes inorgánicos, como el nitrito en las aguas potables, se convierten en un problema sólo si las actividades humanas elevan sus concentraciones a niveles superiores a las recomendables. De hecho, varios metales son esenciales

para la vida pero, por encima de ciertas concentraciones, se vuelven perjudiciales (Newman 2014). Sin embargo, existen casos importantes en los que los metales están integrados en biomoléculas tales como los citocromos y la hemoglobina, o contaminantes tales como metilmercurio y organoestánidos. Similarmente, los contaminantes orgánicos están compuestos por tóxicos no intencionales e intencionales que se convierten en un problema cuando llegan al medioambiente y entran en contacto con las especies no blanco (non-target) en bajas o altas concentraciones (Newman 2014). Los contaminantes orgánicos no intencionales suelen ser por ejemplo desengrasantes, solventes y varios productos industriales; así como algunos compuestos para el cuidado personal (detergentes y jabones) o fármacos (drogas, antibióticos y anticonceptivos) que son diseñados para un beneficio de la población humana aunque puedan causar problemas cuando llegan al medio ambiente. Por otro lado, los compuestos orgánicos intencionales son los plaguicidas que tienen tóxicos para eliminar plagas de animales (insecticidas o rodenticidas), hongos (fungicidas), plantas o malezas (herbicidas), entre otros (Aktar y col. 2009, Newman 2014). Específicamente, los herbicidas constituyen una clase de plaguicidas que abarcan numerosos productos (principios activos) y con una gran diversidad de formas químicas, formulados y presentaciones comerciales que han recibido poca atención como contaminantes ambientales y en especial sobre su efecto no deseado en animales (Walker 2009). Su principal característica es que son usados para el control de malezas en la agricultura y horticultura, aunque también han sido empleados como defoliantes en bosques (por ejemplo en la Guerra de Vietnam), para el control de malezas en jardines, en los bordes de las carreteras, y en los cursos de agua, y como herramientas de manejo en fincas y reservas naturales (Walker 2009). Particularmente, en nuestro país durante la última década, la expansión de monocultivos modificados genéticamente por la agricultura trajo aparejado un incremento de problemáticas relacionadas con la contaminación ambiental debido al uso indiscriminado de plaguicidas en grandes extensiones de nuestro territorio (CASAFE 2013). La tendencia al uso de herbicidas dentro del mercado argentino de valores se ve reflejada en el volumen de comercialización, que representó un 59% de todos los productos fitosanitarios de uso agrícola comercializados durante el período de informe oficial del CASAFE (2013).

Es bien conocido que el incremento de los cultivos sojeros fomenta el uso de otros tipos de plaguicidas alternativos como fungicidas o insecticidas para mejorar el control de malezas herbáceas, siendo los herbicidas aquellos plaguicidas utilizados que se emplean con mayor frecuencia para alcanzar este objetivo (Masters y col. 1996, CASAFE 2013). A su vez, la tendencia indica un aumento en la búsqueda de herbicidas post-emergentes dado que los herbicidas pre-emergentes tienen baja selectividad y un control pobre de malezas en zonas con baja precipitación (Krausz y Kapusta 1998). No obstante, resulta cada vez más difícil descubrir un nuevo herbicida y aún más difícil encontrar uno con un nuevo modo de acción. Hoy en día, aproximadamente 500.000 compuestos deben ser rastreados para descubrir un potencial herbicida; en comparación con 1 de 500 compuestos examinados en la década de 1940 (Tan y col. 2005). Sumado a esto, las malezas han desarrollado tolerancia a los herbicidas y nuevas enfermedades han surgido en respuesta al

establecimiento de monocultivos de soja que amenazan los niveles de producción, y en consecuencia se ha llevado a cabo el desarrollo y la aplicación de nuevos herbicidas (Joensen y col. 2005). La resistencia de los cultivos a los herbicidas es conferida por alguno de los siguientes tres mecanismos: resistencia en el sitio de acción, desintoxicación metabólica y prevención de que el herbicida alcance el sitio de acción. El desarrollo de uno o más de estos tres mecanismos mediante la modificación genética, puede proporcionar resistencia a los herbicidas en un cultivo (Tan y col. 2005, Kawai y col. 2007). En Argentina, como en el resto del mundo, el herbicida glifosato sigue a la cabeza de las ventas aunque en los últimos 10 años el desarrollo y consumo de herbicidas selectivos se incrementó de manera exponencial respecto de los herbicidas tradicionales (Kawai y col. 2007). Como ejemplo de esta situación se pueden mencionar el aumento en el uso de Bentazon (80 %), 2,4D (40 %), imidazolinonas (30 %), flurocloridona (30 %), atrazina (25%), s-metolaclo (10 %), entre otros (CASAFE 2013). Asimismo, a partir de la introducción de las familias de herbicidas que inhiben la enzima acetohidroxiácido sintetasa (AHAS), como imidazolinonas, pirimidinilcarboxilasas, sulfonamidas, sulfonilureas, sulfonil-amino-carbonil-triazolinonas y triazol-o-pirimidinas, aumentó el empleo de varios tipos de herbicidas post-emergentes para tratamiento de cultivos de soja (Zoschke 1994, Kawai y col. 2007).

Los herbicidas de la familia imidazolinonas fueron desarrollados para el control de malezas post-emergentes mediante la inhibición de la enzima AHAS también llamada acetolactato sintetasa, la cual es una enzima clave en plantas para la biosíntesis de aminoácidos de cadenas ramificadas (Zoschke 1994, Krausz y Kapusta 1998, Tan y col. 2005, Kawai y col. 2007, Bindraban y col. 2009). Las imidazolinonas son ampliamente utilizadas debido a que las investigaciones mostraron que varias herbáceas y pastizales nativos son tolerantes a los miembros de esta familia de herbicidas, lo que permite mejorar el establecimiento de pastizales seleccionados (Zoschke 1994, Masters y col. 1996). En este sentido, desde el lanzamiento comercial del maíz tolerante a las imidazolinonas en 1992, se han desarrollado y comercializado otros cuatro cultivos tolerantes a esta familia de herbicidas, ya que es posible desarrollar cultivos tolerantes a la imidazolinonas basados en el mecanismo de resistencia en el sitio de acción (Tan y col. 2005). Esto responde a un nuevo mercado que pretende obtener nuevos tipos de cultivos no transgénicos resistentes a nuevos herbicidas como sucede en el caso de los cultivos resistentes a imidazolinonas del sistema de producción Clearfield® (sistema que combina cultivos resistentes a imidazolinonas con herbicidas imidazolinonas para diferentes regiones geográficas) (Alister y Kogan 2005, Tan y col. 2005).

Actualmente los herbicidas de la familia imidazolinonas están comercialmente disponibles en seis enantiómeros según sus derivados del grupo metilo tales como imazamox, imazaquin, imidazolinona benceno, imazapic, imazapir, e imazetapir (IMZT) (Fig. 2) y son ampliamente utilizados debido a su efectividad para el control de un amplio espectro de malezas de hoja ancha a dosis bajas y alta persistencia del suelo (Vidrine y col. 1993, Zoschke 1994, Alister y Kogan 2005,

Tan y col. 2005, Kawai y col. 2007, Lin y col. 2007). Por ejemplo, los cultivos de maíz y arroz a menudo se rotan con soja; el uso de imidazolinonas es una opción común para poder rotar el cultivo de soja, ya que al utilizar maíz y arroz tolerante a las imidazolinonas, se elimina cualquier riesgo de daño al maíz o al arroz por los residuos resultantes de los herbicidas usados en la soja a lo largo del año (Tan y col. 2005). Por otro lado, se propone el uso de las imidazolinonas debido a su alta persistencia en el suelo, y algunas características responsables de aumentar esta persistencia son el pH bajo del suelo, su humedad o la alta materia orgánica del mismo; por ejemplo, se ha determinado que la persistencia en el suelo para el imazapir puede variar de 90 a 730 días, para el imazapic es 90 días y para el IMZT es de 60 a 360 días (Alister y Kogan 2005).

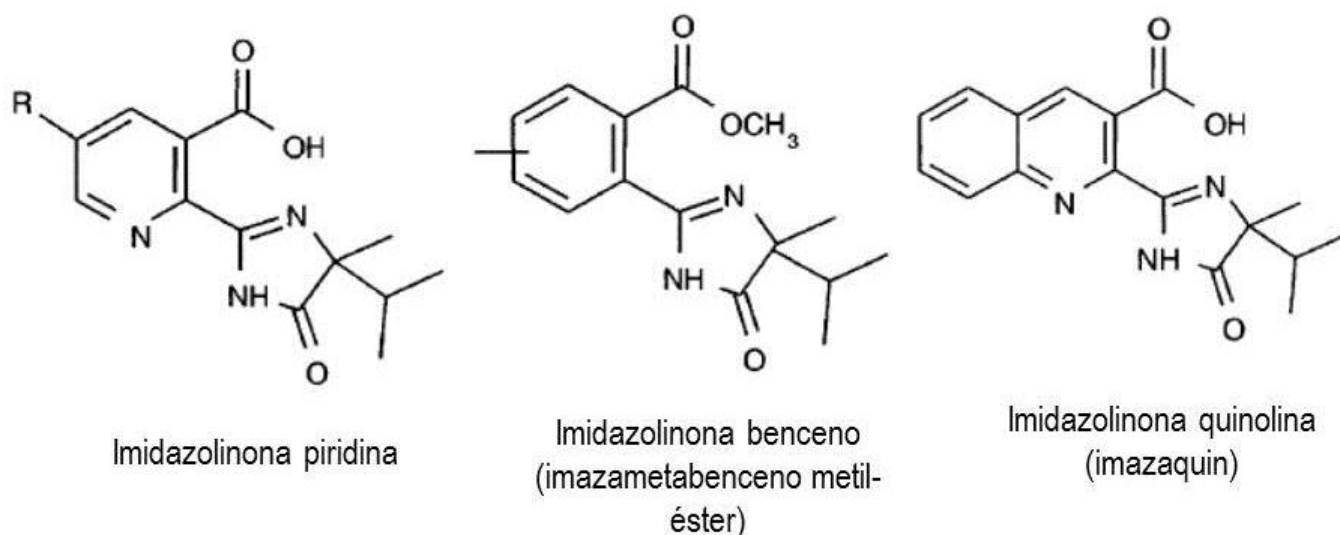


Figura 2. Principales herbicidas imidazolinonas; imazapir: R = H, imazapic: R = CH₃, imazetapir: R = CH₃-CH₂, e imazamox: R = CH₃-O-CH₂. Modificado de Tan y col. (2005).

1.1.3.2. Toxicidad de las imidazolinonas

La relativa baja toxicidad de las imidazolinonas y su clasificación como levemente tóxicos por la U.S. EPA (2000) también ha sido propuesta como una ventaja para el uso de estos herbicidas en los cultivos agrícolas. Brevemente podemos mencionar que según reportes se encontró que imazaquin e imazamox pueden afectar negativamente la abundancia de las poblaciones de plantas acuáticas y el fitoplancton, producir mortalidad en varias especies de peces e inmovilidad por intoxicación en el zooplancton. En el caso de imazaquin, se ha clasificado como levemente tóxico y posible contaminante del ambiente acuático aunque no se tienen registros de sus efectos en la biota no diana (USEPA 2000,

Kegley y col. 2016), no obstante es genotóxico para células de mamíferos expuestas *in vitro* (Losi-Guembarovski y col. 2004). Respecto de imazapir, la información es más detallada y los estudios indican que inhibe el crecimiento en poblaciones del fitoplancton y en invertebrados acuáticos produce mortalidad en el crustáceo *Farfantepenaeus duorarum* (camarón rosado) y en concentraciones superiores 0,18 mg/l, provoca inmovilidad en moluscos y en *Daphnia magna* (Kegley y col. 2016). En invertebrados terrestres, produce efectos a nivel poblacional en abejas (Kegley y col. 2016) y altera la fecundidad, el desarrollo y crecimiento en la mariposa norteamericana, *Apodemia mormo langei* (mariposa metálica de Lange) (Stark y col. 2012). Por otra parte, en vertebrados acuáticos produce mortalidad en peces como *Barbus gonionotus* (barbo plateado), *Ictalurus punctatus* (pez gato americano), *Lepomis macrochirus* (pez sol), *Menidia menidia* (sardina atlántica o pez blanco), *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Tilapia nilotica* (tilapia del Nilo) en un rango de concentraciones entre 0,004 a 0,18 mg/l (Kegley y col. 2016). Otros estudios demostraron que imazapir puede producir efectos a nivel bioquímico alterando los parámetros metabólicos en sangre (glucosa, proteína, aminoácidos y amonio), alteración en los niveles de proteínas y de las enzimas oxidativas y colinesterasas (Moraes y col. 2011) y efectos genotóxicos por inducción de micronúcleos en *Tilapia rendalli* (tilapia del Congo) (Grisolia 2002); mientras que en anfibios se demostró que el herbicida produce mortalidad en un rango entre 14,7 a 1739 mg/l en larvas de *Litobathes catesbeianus* (rana toro) (Trumbo y Waligora 2009), pero no se encontraron efectos en el comportamiento, el crecimiento y desarrollo de *Rana pretiosa* (rana manchada de Oregón) luego de una exposición aguda y crónica a concentraciones entre 4,8 y 9,7 mg/l (Yahnke y col. 2013). Por último, el caso de IMZT se analizará en detalle a continuación (sección 1.1.4). Finalmente, por lo expuesto anteriormente, se puede observar que la información respecto a la toxicidad y los efectos adversos de las imidazolinonas sobre los organismos no diana, es escasa y fragmentada.

1.1.4. Herbicida Imazetapir: características, toxicidad y genotoxicidad

Particularmente, IMZT [5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidroimidazol-1H-2-yl)-ácido nicotínico] es un miembro de los herbicidas imidazolinonas utilizado en cultivos de alfalfa, arveja, maíz (resistente a imidazolinonas), maní, poroto y soja, entre otros para el control de al menos 44 especies de herbáceas nativas como gramíneas, malezas de hoja ancha y otras en una variedad de cultivos y situaciones no agrícolas (MacBean 2012, CASAFE 2013). Este herbicida tiene un bajo coeficiente de absorción y posee una elevada solubilidad en agua (1400 mg/l a 25°C), teniendo inclusive elevada afinidad por el agua y el suelo (Senseman 2007, O'Neil, 2013). Según Qian y col. (2015), quienes evaluaron el modo de acción y toxicidad de IMZT en las raíces de la crucífera *Arabidopsis thaliana*, IMZT actúa inhibiendo la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada de valina, leucina e isoleucina no sólo por supresión de la cadena ramificada, sino también por incrementar el catabolismo de la cadena ramificada afectando de esta manera el patrón de crecimiento en la raíz, brotes y hojas de la planta. Además, para un mejor control de las malezas, suelen encontrarse mezclas comerciales

con otros plaguicidas como glifosato (Alteza®, Flier, Estrella Imi Plus, Lince, Oneway, Realeza Surcos, Realeza Red Surcos, Estoque, Limit, Queen Sigma o Gentopir), imazapir (Lightning®, Interfield®, Cristal o Maíz Protector), clorimuron etil (Fabian), flumioxazin (Nufarm Zetamaxx), fluroxipir (Rolling), quinclorac (Clearpath® 75 WG) y saflufenacil (Optill®); o mezclas no comerciales recomendadas para el uso del producto con herbicidas como pendimetalin y acetoclor, entre otros (CASAFE 2013).

El Departamento de Regulación de Plaguicidas de California ha clasificado a IMZT como un posible contaminante del agua subterránea (Kegley y col. 2016); mientras que para la U.S. EPA está en la categoría de compuesto “levemente tóxico” (Clase III) (USEPA 1989) y la OMS ha considerado que es poco probable que sea peligroso (Kegley y col. 2016). Por otro lado, la Unión Europea ha clasificado a IMZT como un compuesto peligroso para el ambiente y ha reportado a este herbicida como irritante perjudicial para las vías respiratorias, la piel y los ojos (Kegley y col. 2016). Con respecto a los estudios ecotoxicológicos de IMZT, la información es escasa sobre los efectos de este herbicida en organismos no diana. En plantas como *Lemna gibba* (lenteja de agua), IMZT es altamente tóxico (Magdaleno y col. 2015, Reimche y col. 2015, Kegley y col. 2016). Por otro lado, se ha reportado con baja toxicidad para algas e invertebrados acuáticos (Magdaleno y col. 2015, Reimche y col. 2015) aunque en el alga verde *Raphidocelis subcapitata* se observó una importante inhibición del crecimiento luego de la exposición a un formulado comercial de IMZT (Magdaleno y col. 2015). Sumado a esto, se ha reportado también que este herbicida afecta negativamente las comunidades de quironómidos (Marchiori y col. 2012) y de zooplancton como rotíferos, cladóceros y copépodos (Reimche y col. 2015). Entre los invertebrados terrestres, en particular en insectos se ha reportado una sensibilidad desde extremadamente alta en abejas, hasta una toxicidad baja en anélidos como las lombrices de tierra (Kegley y col. 2016); también se demostró que produce mortalidad, afecta el crecimiento y altera el comportamiento en *Spilarctia obliqua* (oruga peluda de Bihar) a partir de 0,25 mg/l (Gupta y Bhattacharya 2008); y se descubrió que afecta la fertilidad y el comportamiento de *Telenomus podisi* (Hymenoptera) cuando es aplicado en mezclas en campos de arroz (Pazini y col. 2017). Finalmente, se ha reportado baja a moderada toxicidad aguda en ratas cuando la exposición fue por vía oral (Kegley y col. 2016). Sumado a esto, en vertebrados acuáticos, se reportó que el herbicida no es un tóxico letal en especies de peces como *I. punctatus*, *L. macrochirus* y *O. mykiss* (Kegley y col. 2016). No obstante, se reportó que la exposición a IMZT como principio activo y en formulados comerciales, produce estrés oxidativo en células hepáticas de *Cyprinus carpio* (carpa común) al evaluar distintos parámetros bioquímicos como la respuesta de las enzimas de estrés oxidativo y enzimas colinesterasas (Moraes y col. 2011). Estos efectos también fueron reportados para *O. mossambicus* (tilapia de Mozambique) luego de la exposición a formulados comerciales (Pasha y Singh 2005, Pasha 2013). De cualquier manera, hasta el momento para otros vertebrados acuáticos como los anfibios, no se tiene registros sobre los posibles efectos adversos de IMZT.

Particularmente, si nos enfocamos en los efectos cito y genotóxicos, los investigadores han concluido que IMZT no es mutagénico para bacterias utilizando el ensayo de mutación en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en presencia o ausencia de activación metabólica (Magdaleno y col. 2015). De la misma manera, no se detectó mutagenicidad en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y para el ensayo CHO/HGPRT (Fragiorgio y col. 2008). Mientras tanto, en mamíferos, los reportes indican que IMZT no induce aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea de ratas, y se han reportado tanto resultados negativos como positivos para células CHO con y sin activación metabólica, respectivamente (USEPA 1989). Además, se ha comprobado por diferentes metodologías que IMZT, tanto su compuesto activo como en formulados, es capaz de inducir efectos cito- y genotóxicos en células meristemáticas de las raíces de *Allium cepa* (cebolla), *Lactuca sativa* (lechuga), *Triticum durum* (trigo duro) y *Vicia faba* (haba) (El-Nahas 2000, Liman y col. 2015, Magdaleno y col. 2015).

1.2. Efectos de los estresores ambientales sobre los ecosistemas

La significancia del término contaminantes ambientales tiene diferentes connotaciones y abarca conceptos importantes como contaminante, xenobiótico, estresor y estrés (Newman 2014). En ese sentido, se ha adoptado la terminología propuesta por Newman (2014), quien destaca que:

- Contaminante: es una sustancia liberada al ambiente por las actividades humanas. Este concepto no implica efectos adversos del contaminante aunque éste pueda estar presente.

- Xenobiótico: es un químico extraño o un material no producido en la naturaleza y normalmente no es considerado un componente constitutivo de un sistema biológico específico. Usualmente esta terminología es aplicada para químicos fabricados en laboratorios.

- Estresor: es aquel factor o agente que produce un estrés en cualquier nivel de organización biológica.

- Estrés: diferente a la definición de estrés fisiológico queda definido en ecotoxicología como una respuesta a un factor o el efecto de un factor desorganizador o dañino reciente, a cualquier nivel de organización biológica.

1.2.1. Ingreso de los estresores ambientales a los ecosistemas

Los plaguicidas, fertilizantes, metales pesados, fármacos y otros compuestos que ingresan al ambiente son considerados como estresores ambientales. Los herbicidas, por ejemplo, son introducidos a los ecosistemas naturales por aplicación directa; escorrentía superficial por aplicaciones en un cultivo o en bosques; o inclusive por deposición atmosférica (Vitousek y col. 1997, Ritter y Shirmohammadi 2000, Egea-Serranoy col. 2012) (Figura 3). La presencia de

estresores ambientales como los plaguicidas ha sido ampliamente registrada en los últimos años en los diferentes ecosistemas del mundo (principalmente en ecosistemas acuáticos) (Simonich y Hites 1995, Laabs y col. 2002, Turgut 2003, Gilliom y col. 2006, Tuduri y col. 2006, Ali y col. 2014, De Gerónimo y col. 2014, Grung y col. 2015, Yadav y col. 2015, Etchegoyen y col. 2017) y se estima que estos estresores ambientales se incrementen en el futuro cercano (Tilman y col. 2001, Egea-Serrano y col. 2012). Poniendo el foco en los herbicidas utilizados en la agricultura, se conoce que una parte de los herbicidas aplicados alcanzan el objetivo sobre los organismos diana pero el resto de los residuos de estos plaguicidas se reparte y distribuye entre los compartimentos suelo, aire y/o agua, contaminando de esta manera una variedad de microhábitat, incluidos los lagos y estanques en las inmediaciones de los cultivos (Greulich y Pflugmacher 2003, Rohr y Crumrine 2005). La llegada de herbicidas a los ecosistemas acuáticos naturales límnicos o dulceacuícolas, sean lóticos o lénticos, como lagunas o charcos, permanentes o temporales, puede ocurrir luego de intensas lluvias que pueden trasladar o mover los plaguicidas desde zonas agrícolas a los arroyos cercanos por escurrimiento superficial o subterráneo (Walker 2009, Zhuang y col. 2015). Por otro lado, se puede producir la contaminación de los ecosistemas acuáticos por herbicidas, mediante la descarga de agua del lavado de equipos que han tenido contacto con plaguicidas o por lavado inadecuado de tanques contenedores; por arrojar envases vacíos con remanentes de producto en su interior; por la aplicación directa mediante fumigaciones terrestres y/o aéreas cercanas a los ríos y lagos; por derrames accidentales; por filtraciones en los depósitos de almacenamiento o inclusive por residuos descargados en el suelo (del Puerto Rodríguez y col. 2014, Zhuang y col. 2015).

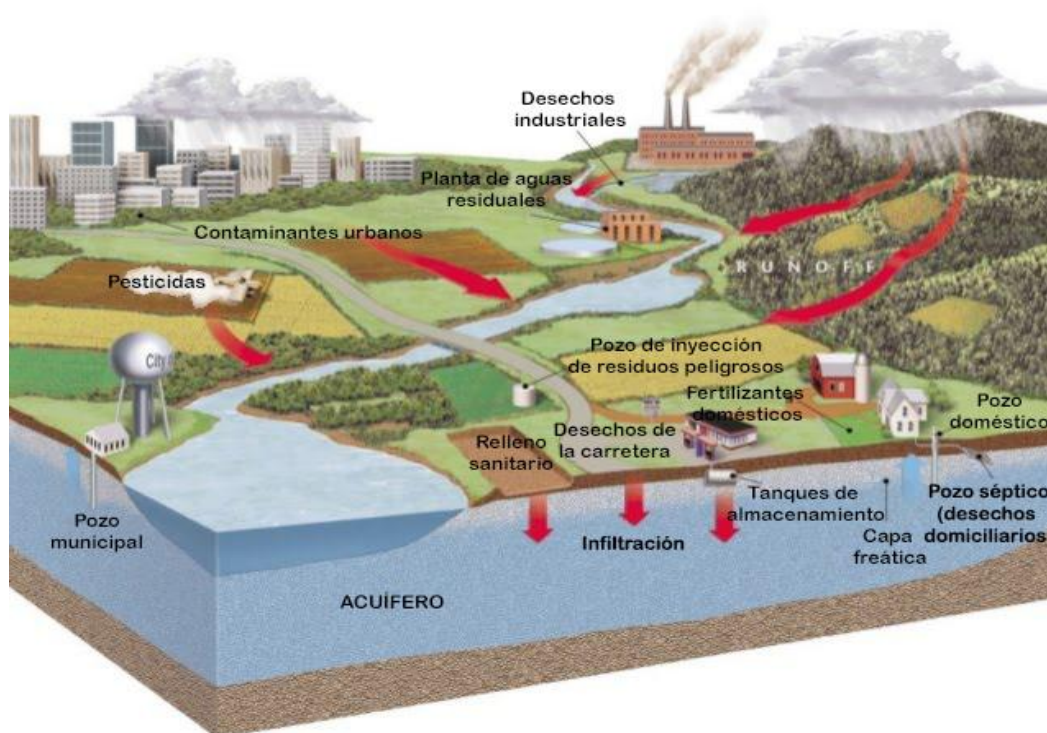


Figura 3. Principales destinos de los estresores ambientales en los ecosistemas acuáticos. Modificada del sitio web “Pollution and Water Quality” (<https://sites.google.com/a/staff.lisd.net/crollcorner/disruption-of-systems-human-impact/pollution-and-its-indicators>).

Durante los últimos años ha crecido el interés de la sociedad y los investigadores por el destino de los plaguicidas en el medio ambiente y su impacto sobre la calidad del agua superficial y subterránea, con énfasis en la calidad del agua potable y los efectos adversos sobre los organismos acuáticos no blanco (Pimentel 1971, Carter 2000, Gagnon y Saulnier 2003, Gavrilesco 2005, Löffler y col. 2005, Lapworth y col. 2012, Luo y col. 2014, Zhuang y col. 2015). Las investigaciones han mostrado que las consecuencias por el uso intensivo de plaguicidas, es un factor que hace vulnerable a los ecosistemas acuáticos porque produce una amenaza no sólo sobre los organismos no blanco que habitan esos cuerpos de agua, sino también sobre la población humana que utiliza ese recurso hídrico (Carter 2000, Bale y col. 2008, Aktar y col. 2009, Kim y col. 2017). Si bien se puede detectar la presencia de plaguicidas en el agua, resulta fundamental determinar la frecuencia y la magnitud de la contaminación para poder llevar a cabo evaluaciones sobre los efectos, a fin de determinar el riesgo para la salud de las poblaciones humanas que utilizan el recurso y para los organismos acuáticos no blanco (Carter 2000, Newman 2014). En este contexto, las investigaciones relacionadas con este tema, plantean la necesidad de implementar nuevas políticas y reglamentaciones que controlen el uso de estos productos, así como también herramientas eficaces y rápidas para detectar la presencia de estresores ambientales en los cuerpos de agua y para establecer sus

efectos adversos en la salud humana y los organismos no blanco (Tilman y col. 2001, Holvoet y col. 2007, Gregoire y col. 2009, Walker 2009, Newman 2014).

1.2.2. Consecuencias ambientales del uso de plaguicidas en la salud humana y en la biodiversidad

El uso de plaguicidas es la estrategia más común para el control de malezas, insectos plagas y para evitar las enfermedades en los cultivos; pero esto también constituye un factor que afecta considerablemente los ecosistemas y recursos naturales así como la salud de los trabajadores rurales y los posibles consumidores (López y col. 2012). La exposición a plaguicidas de distinto tipo y origen, al igual que sustancias con propiedades potencialmente genotóxicas, constituyen un riesgo para la salud humana y animal (USEPA 1974, IARC 1976, 1977, 1986, 1987a,b, 1991, 2015, McLaughlin y Mineau 1995, Margni y col. 2002, Bilenca y col. 2009, Newman 2014, Diamond y col. 2015, Kegley y col. 2016, Kim y col. 2017). En este contexto, el uso de plaguicidas como herbicidas e insecticidas, ha sido el objeto de investigaciones tendientes a analizar su potencial impacto sobre organismos no blanco en los agroecosistemas (Margni y col. 2002, Bilenca y col. 2009). Específicamente, varios autores han resumido los efectos de los estresores ambientales de amplio uso sobre la salud humana de trabajadores agrícolas y fumigadores, evaluando por ejemplo la presencia de insecticidas como PCBs (bifenilos policlorinados), organoclorados tales como DDT (diclorofenil-tricloroetano) o endosulfán, organofosforados como malatión o clorpirifos, piretroides como cipermetrina o deltametrina, carbamatos; y herbicidas como atrazina, glifosato o 2,4-D; e inclusive en mezclas. Los efectos en la salud humana van desde daños a nivel genético, neurotoxicidad aguda y crónica, daño pulmonar, efectos reproductivos, meta hemoglobinemia infantil, y hasta una amplia variedad de cánceres (Weisenburger 1993, Longnecker y col. 1997, Bolognesi 2003, Hallenbeck y Cunningham-Burns 2012, López y col. 2012, Mostafalou y Abdollahi 2013, Vazquez y col. 2017). Además, se ha mencionado que tanto en el ingrediente activo de un plaguicida como su formulado comercial, puede producir efectos adversos en la salud humana por daños a nivel mitocondrial, necrosis y muerte celular programada en dosis menores a las aplicadas en las prácticas agrícolas (López y col. 2012). Particularmente, en los últimos años, muchos estudios se han enfocado en la importancia de evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos tanto en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas (Bolognesi 2003, Abdollahi y col. 2004, Simoniello y col. 2008, Simoniello y col. 2010, López y col. 2012, Hernández y col. 2013, Carbajal-López y col. 2016) como en líneas celulares expuestas a herbicidas (Soloneski y col. 2007, Nikoloff y col. 2013, Nikoloff y col. 2014a, Soloneski y col. 2017) utilizando diferentes metodologías de citotoxicidad y genotoxicidad como evaluaciones de aberraciones cromosómicas, de intercambio de cromátidas hermanas, ensayo de micronúcleos (MNs) y cometa (también conocido como SCGE). Estas investigaciones han demostrado, entre otros aspectos, que el uso de plaguicidas organofosforados o carbámicos produce la inducción de daño en el material genético de linfocitos humanos y de esta manera fueron la base para definir a los insecticidas organofosforados como posibles agentes cancerígenos para el ser

humano (IARC 1991, Knaak y col. 2011, Mostafalou y Abdollahi 2013). En otras investigaciones, se ha observado que algunos herbicidas de uso intensivo, como el caso del bromoxynil, tiene una estrecha relación con la aparición de cáncer, ocasionando malformaciones fetales en mamíferos mantenidos en laboratorio y elevada toxicidad en plantas y peces (Chernoff y col. 1991, Kawanishi y col. 2003).

El efecto de los plaguicidas sobre los ecosistemas y su biodiversidad, ha sido otro foco de atención de los investigadores quienes han puntualizado su importancia dado que los ecosistemas albergan una alta diversidad biológica y es donde suelen concentrarse localmente los plaguicidas (Bilenca y col. 2009). En este contexto, el incremento en el uso de plaguicidas en agroecosistemas se ha planteado como una de las causas de la pérdida mundial de la biodiversidad. En general, se plantea que los estresores ambientales alteran la estructura y funcionamiento del ecosistema lo que conduce a tener ambientes empobrecidos con menores tasas de productividad, descomposición más lenta, alteración en el ciclo de los nutrientes y sitios dominados por pocas especies, resultando a largo plazo en menos biodiversidad o hasta ambientes sin biota asociada cuando los periodos de estrés ambiental son intensos y constantes en el tiempo (Fiedler 1992, Freedman 1995, Walker 2009, Kendall y col. 2010, Vörösmarty y col. 2010, McMahon y col. 2012, Beketov y col. 2013, Köhler y Triebkorn 2013). En ese sentido, varios autores han investigado y resumido los efectos de los herbicidas e insecticidas sobre la biodiversidad de los ecosistemas (Pimentel 1971, McLaughlin y Mineau 1995, Stark y Banks 2003, Khan y Law 2005, Mineau 2005, Rohr y Crumrine 2005, Walker 2009, Kendall y col. 2010, Sparling y col. 2010, Beketov y col. 2013). Por otra parte, se ha remarcado que los plaguicidas, mejor definidos como estresores ambientales, pueden provocar alteraciones (efectos) de formas complejas en los ecosistemas en varios niveles; por ejemplo, afectando gremios de organismos con estrategias de alimentación o uso de recursos similares, lo cual afecta a grupos taxonómicos enteros. Esto a su vez perturba la función de la comunidad debido a consecuentes cambios en la diversidad y abundancia de especies (Clements y Newman 2003, Kendall y col. 2010, Köhler y Triebkorn 2013). En la actualidad, la liberación al medio ambiente de estresores ambientales capaces de causar daño genético, representa una amenaza para la salud humana y ecológica. En ese sentido, los investigadores han remarcado el interés por evaluar los efectos citogenéticos de los estresores ambientales, como los plaguicidas, debido a que este tipo de daño tiene el potencial para alterar la variabilidad genética de una población expuesta por mutagénesis en células somáticas y germinales, producir declinaciones demográficas, alterar las tasas de migración, produciendo efecto de cuello de botella de la población, además causar cáncer y reducir el estado de salud o *fitness* (por ejemplo; crecimiento, fertilidad y fecundidad). Por ello también pueden ser una herramienta útil para la salud o calidad de un ecosistema desde niveles ecológicos individuales hasta poblacionales (Guttman 1994, Depledge 1998, Bickham y col. 2000, Shugart y col. 2002, van Straalen y Timmermans 2002, Jha 2008, Matson y col. 2009, Shaffer y col. 2015).

1.2.3. Ecotoxicología como nueva ciencia: breve reseña

Como fuera mencionado anteriormente, el objetivo clave de la “revolución verde” fue mejorar la producción de cultivos mediante una aplicación integrada de organismos GM de alto rendimiento, fertilizantes químicos y plaguicidas, lo que también trajo consigo los problemas generales de contaminación a medida que comenzó la segunda mitad del siglo XX (Evenson y Gollin 2003, Newman 2014). Durante la primera mitad del siglo XX surgieron conceptos, enfoques e instituciones para abordar los problemas de la conservación de los recursos naturales, la calidad del ecosistema, la seguridad industrial en el lugar de trabajo y los productos químicos nocivos en los alimentos y las drogas. Consecuentemente, la evolución social comprometida con estas problemáticas estableció un enfoque, un paradigma y una ética para todo el mundo, con el objetivo de abordar y proponer soluciones en relación al uso de plaguicidas en los ecosistemas y de esta manera, los contaminantes ambientales se convirtieron en un grave problema social a resolver durante la segunda mitad del siglo XX (Newman 2014).

En ese contexto, surge la Ecotoxicología, como la ciencia que tiene el objetivo de evaluar los estresores ambientales en la biosfera y sus efectos sobre los constituyentes de la misma, incluidos los seres humanos (Newman 2014). La ecotoxicología es una ciencia de síntesis que combina intuiciones y métodos de muchas disciplinas, ya que busca respuestas sobre el efecto de los estresores ambientales a nivel genético-molecular (por ejemplo inactivación de enzimas por un contaminante), a nivel individual (por ejemplo, evaluando alteraciones en el desarrollo), a nivel población (por ejemplo, extinción local) y a los niveles de organización biológica de la biosfera (por ejemplo, cambio climático global); resuelve además cuestiones sobre el destino y transporte de los productos químicos desde su origen (por ejemplo, la especiación de metal disuelto), al hábitat (por ejemplo, acumulación de contaminantes en hábitats) y a los niveles de escala física de biosfera (por ejemplo, destilación global de plaguicidas volátiles) (Newman 2014). Actualmente, la Ecotoxicología se está convirtiendo rápidamente en una disciplina madura y se espera que logre un equilibrio eficaz de conocimientos para abordar mejor sus objetivos científicos, tecnológicos y prácticos. Dichos objetivos científicos deben expandirse en todas las direcciones, especialmente hacia fenómenos más globales y a largo plazo, y con los objetivos tecnológicos y prácticos debería ocurrir lo mismo. Comprendiendo esto, se espera que las leyes y regulaciones en salud y medioambiente que actualmente se aplican en la mayoría de los países deberían evolucionar rápidamente para adaptarse a las mejoras continuas de la tecnología y la ciencia (Newman 2014).

Finalmente, cabe destacar que uno de los mayores desafíos en Ecotoxicología es rastrear los efectos directos e indirectos de los estresores ambientales desde el nivel molecular hacia niveles de mayor complejidad, llegando inclusive a evaluar las comunidades de especies y la funcionalidad de los ecosistemas (Köhler y Triebkorn 2013, Newman 2014).

1.3. Los anuros como modelo para la evaluación de estresores ambientales en ecotoxicología

1.3.1. Pérdida de la biodiversidad mundial de anuros

El impacto negativo de las actividades antrópicas sobre la biodiversidad es cada vez más notorio y desde hace 30 años, a nivel mundial los anfibios son el grupo de vertebrados más vulnerable con aproximadamente el 41% de las especies amenazadas (Blaustein y Wake 1990, Alford y Richards 1999, Houlahan y col. 2000, Kiesecker y col. 2001, Beebee y Griffiths 2005, Egea-Serrano y col. 2012, IUCN 2017). Las enfermedades emergentes, la destrucción del hábitat, la introducción de especies exóticas, el cambio climático global y la contaminación de los hábitat tanto terrestres como acuáticos, han sido propuestos como estresores potenciales y factores influyentes en la disminución mundial de las poblaciones de anfibios (Carey y Bryant 1995, Davidson y col. 2002, Blaustein y col. 2003, Collins y Storfer 2003, Mann y col. 2009, Sparling y col. 2010, Blaustein y col. 2011, Egea-Serrano y col. 2012, Brühl y col., 2013). Identificadas estas amenazas, es fundamental determinar la influencia y magnitud de sus efectos sobre las poblaciones de anfibios para ayudar a desarrollar estrategias adecuadas de manejo y conservación (Egea-Serrano y col. 2012).

1.3.2. Evidencias de los efectos de estresores ambientales en anuros

En el contexto antes mencionado, durante el periodo de 1952 al 2015 se han registrado más de 17.500 referencias bibliográficas de ecotoxicología sobre la biodiversidad de vertebrados, de las cuales más de 11.600 (aproximadamente 66.7%) fueron en peces, más de 3.500 (aproximadamente 19.9%) en mamíferos, más de 1.500 (aproximadamente 8.8 %) en aves, más de 760 (aproximadamente 3.8%) para anfibios, y más de 150 (aproximadamente 0.8%) para reptiles, según revisiones presentadas recientemente (Sparling y col. 2010, Morínigo Egusquiza 2016). Como se puede observar, sólo una fracción muy pequeña de la literatura sobre ecotoxicología de vertebrados pertenece a anfibios.

En las décadas pasadas, el número de publicaciones era bastante reducido, pero a partir de 1990 aproximadamente, la cifra de publicaciones sufrió un salto abrupto, como producto del descubrimiento de la disminución, y en algunos casos, de la extinción, de las poblaciones de anfibios, dilucidado durante el Primer Congreso Mundial de Herpetología en 1989 (Blaustein y Wake 1990, Morínigo Egusquiza 2016). Hasta ese momento, los estudios realizados sobre la diversidad y ecología de anfibios abarcaron las familias de anuros conocidas como Hylidae, Leptodactylidae, Bufonidae, Ranidae. En este contexto, los estudios ecotoxicológicos llevados a cabo en 150 especies de anuros como modelo se han focalizado principalmente en las familias Ranidae, Bufonidae, Pipidae e Hylidae (Morínigo Egusquiza 2016). No obstante, es importante destacar que una gran parte de estos estudios que investigan los efectos de los estresores ambientales en los anfibios se han llevado a cabo en condiciones de laboratorio, mientras que en menor proporción estos estudios se han realizado en campo o en las condiciones naturales como los mesocosmos (Egea-Serrano y col. 2012). En

este sentido, como la contaminación causada por plaguicidas ha sido uno de los factores propuestos como responsable de la disminución numérica de poblaciones de anfibios a nivel mundial, gran cantidad de herpetólogos y ecotoxicólogos en los últimos 20 años se han dedicado a evaluar y compendiar los efectos de estos estresores ambientales a diferentes escalas o niveles ecológicos (Hall y Henry 1992, Linder y Grillitsch 2000, Netting 2000, Sparling y col. 2000, Relyea 2005, Relyea y col. 2005, Mann y col. 2009, Sparling y col. 2010, Brühl y col. 2011, Egea-Serrano y col. 2012, Brühl y col. 2013). Los efectos documentados de los estresores ambientales en los anfibios, en especial de plaguicidas como herbicidas e insecticidas, varían de efectos letales a efectos subletales incluyendo disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo y metamorfosis, también se registran aumentos en la frecuencia de anomalías morfológicas durante el desarrollo, mayor susceptibilidad a enfermedades y alteraciones del comportamiento (Egea-Serrano y col. 2012).

1.3.3. Anfibios como indicadores de la calidad ambiental

Los anfibios en los ecosistemas son componentes abundantes y funcionalmente importantes de la mayoría de los ecosistemas dulceacuícolas y terrestres, con rasgos fisiológicos y ecológicos particulares, por los cuales se han sugerido como excelentes bioindicadores de la salud ambiental (Sparling y col. 2000, De Garady y Halbrook 2006). Estos rasgos o características especiales son la piel permeable, su rol en redes tróficas, huevos sin cáscara y embriogénesis expuesta, larvas acuáticas de vida libre, dependencia de dos ambientes (acuático y terrestre) a lo largo de su ciclo de vida y un acotado “home-range” sin migrar grandes distancias (Blaustein y Wake 1990, Stebbins y Cohen 1995, Blaustein y col. 2003, Brühl y col. 2013). Por ejemplo, se conoce que los procesos de absorción dérmica de los plaguicidas en los anfibios son dos órdenes de magnitud más rápidos que en los mamíferos, lo que permite evaluar rápidamente el efecto directo de estos estresores ambientales en la biota, una vez que ingresan a los ecosistemas acuáticos (Quaranta y col. 2009, Brühl y col. 2011). En este contexto, por la disminución de sus poblaciones a nivel mundial y por los efectos adversos plaguicidas sobre su bienestar, Kendall y col. (2010) proponen a los anfibios como el modelo biológico de la nueva era para evaluaciones ecotoxicológicas de la salud de los ecosistemas.

1.3.4. Ecotoxicología de anuros en Argentina: breve reseña y nuevos objetivos

En Argentina, los primeros estudios ecotoxicológicos en especies de anuros autóctonos fueron llevados a cabo en 1960 y continúan en la actualidad, por el grupo del Dr. Salibián y col., afianzándose con publicaciones sobre larvas de anuros expuestas a diferentes plaguicidas en ensayos toxicológicos y utilizando *Rhinella arenarum* como especie modelo, para estandarizar bioensayos en evaluaciones de toxicidad de agua en ríos urbanos contaminados y evaluando diferentes parámetros hematológicos como puntos finales (Salibián 1992, Ferrari y col. 1997, Demichelis y col. 2001, Ferrari y col. 2005, Chiesa y col. 2006).

Por otro lado, a partir de la década del 90 hasta la actualidad, el Dr. Herkovits y col. publican sus resultados evaluando los efectos a nivel individual en anuros como la rana africana de uñas *Xenopus laevis* y el sapo común *R. arenarum* expuestos experimentalmente a varios estresores ambientales como metales pesados y plaguicidas (Pérez-Coll y col. 1988, Herkovits y Pérez-Coll 1993, Herkovits y Helguero 1998, Brodeur y col. 2009, Aronzon y col. 2011); lo que posteriormente concluye en el desarrollo del test de toxicidad para estudios ecotoxicológicos estandarizados para embriones de anfibios utilizando muestras ambientales del área de Buenos Aires, ensayo conocido como AMPHITOX (Herkovits y col. 2002, Herkovits y Perez-Coll 2003).

En la región centro este de la Argentina, donde se distinguía el gran avance del modelo agrícola, el grupo de investigaciones del Dr. Lajmanovich y col., desde el año 1998 llevan a cabo estudios sobre la caracterización del riesgo ambiental de los agroquímicos y los efectos que producen los herbicidas e insecticidas sobre larvas y adultos de anfibios a distintas escalas ecológicas desde el nivel individual (alteraciones morfológicas, etológicas y mortalidad) hasta el nivel bioquímico (evaluando la actividad de las enzimas colinesterasas y de stress oxidativo), tanto en laboratorio como en anuros que habitan agroecosistemas (Attademo y col. 2007, Peltzer y col. 2008, Attademo y col. 2011, Lajmanovich y col. 2012).

En esta misma línea, hacia principios del año 2000 y hasta la actualidad, surgen nuevos estudios sobre el efecto de los estresores ambientales, utilizando bioensayos de toxicidad estandarizados y evaluando estos efectos in situ en anuros que habitan agroecosistemas de la provincia de Buenos Aires, mediante las investigaciones del grupo coordinado por la Dra. Ronco y llevado a cabo por el Dr. Natale y la Dra. Brodeur, quienes ponen énfasis en estudiar los efectos a diferentes escalas de organización y evaluando estos efectos principalmente a nivel individual con alteraciones morfológicas, etológicas, de crecimiento y desarrollo en especies representativas de los agroecosistemas pampeanos para determinar las alteraciones producidas por los plaguicidas (Natale y col. 2000, Natale y col. 2006, Agostini y col. 2009, 2010, Brodeur y col. 2011, 2012, Ruiz de Arcaute y col. 2012).

Sumado a esto, el grupo de investigaciones de la Dra. Pechen de D'Angelo y col. en la región sur de Argentina plantea la necesidad de implementar nuevas herramientas o biomarcadores que permitan detectar los efectos de los plaguicidas rápidamente y antes que los daños sean irreversibles en los anuros y así utilizarlos para evaluaciones ecotoxicológicas (Venturino y col. 2003, Venturino y Pechen de D'Angelo 2005). Estas conclusiones fueron abordadas por estos investigadores luego de varios años evaluando, mediante bioensayos con herbicidas e insecticidas, las respuestas bioquímicas al estrés oxidativo en la especie ampliamente estudiada de Argentina, *R. arenarum* (Venturino y col. 2001a, 2001b, Ferrari y col. 2004). En este contexto, actualmente estos investigadores se han focalizado en utilizar las respuestas bioquímicas e individuales como biomarcadores para evaluar el riesgo potencial de los plaguicidas en anuros como

organismos no diana (Venturino y col. 2007, Anguiano y col. 2008, Ferrari y col. 2008, Lascano y col. 2011, Rosenbaum y col. 2012).

En los últimos años, con la escasez de estudios sobre los efectos citogenéticos de plaguicidas en anuros de Argentina y la urgente necesidad de desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico ambiental, surgen nuevas investigaciones sobre la citotoxicidad y genotoxicidad de plaguicidas en anuros de Argentina, tanto en estudios de laboratorio como de campo, desde el grupo del Dr. Larramendy y col. En dichos estudios, los investigadores evalúan efectos a diferentes niveles ecológicos tales como alteraciones en el desarrollo en embriones y larvas, alteraciones en enzimas de estrés oxidativo en adultos hasta efectos genotóxicos y citotóxicos en larvas y adultos de *R. arenarum* y *Boana pulchella* inducidos por exposición a diferentes formulados comerciales y principios activos tanto de insecticidas como de herbicidas (Vera Candioti y col. 2010, Brodeur y col. 2012, Nikoloff y col. 2014b, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014). No obstante, a pesar de la información obtenida hasta el momento en estas investigaciones quedan varias preguntas por resolver sobre el modo de acción de los plaguicidas en anuros locales, las diferencias en la susceptibilidad de las especies pampeanas a los plaguicidas, las interrelaciones de estas respuestas biológicas o biomarcadores a diferentes niveles y la posible utilización de estas respuestas en anuros locales como herramientas bioanalíticas para evaluaciones de riesgo ambiental.

1.4. Biomarcadores como herramienta ecotoxicológica

Desde los inicios de la Ecotoxicología como ciencia, los investigadores han buscado conocer el modo en que los estresores ambientales ingresan, se distribuyen, interaccionan y afectan a los diferentes compartimientos del ambiente ya sea en el aire, suelo, agua o la biota. Una de las maneras de conocer el efecto directo y el modo de acción instantáneo de un estresor ambiental es evaluando las respuestas biológicas (efectos), exponiendo organismos a concentraciones ambientales o variables de contaminantes mediante bioensayos de toxicidad. Es por eso que durante los últimos 20 años, gran parte de los ecotoxicólogos se han dedicado a evaluar diferentes biomarcadores en distintas especies modelo, como herramientas bioanalíticas, buscando encontrar respuestas y generar conocimiento para la toma de decisiones (Connon y col. 2012).

1.4.1. Concepto de biomarcadores

De manera general, los *biomarcadores* pueden definirse como indicadores o señales de alerta en sistemas biológicos o muestras, de cambios mensurables a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico, patológico o de comportamiento en respuesta a xenobióticos o a un estresor ambiental (Gupta 2014). Para los ecotoxicólogos la definición

de biomarcador es más específica y refiere a una cualidad celular, bioquímica, fisiológica o histológica en organismos vivos, usada para evaluar la exposición o efecto de un tóxico o estresor ambiental (Melancon y col. 1992, Van der Oost y col. 2003, Newman 2014).

Estas características hacen que se los proponga como señales de alerta temprana que permiten detectar efectos adversos, inducidos por un estresor ambiental a tiempos cortos y bajas concentraciones, antes que estos produzcan efectos mayores, irreversibles, incluso a niveles ecológicos de mayor jerarquía/relevancia (individuo, población, comunidad, ecosistema) (Venturino y col. 2003, Walker 2009, Sparling y col. 2010, Newman 2014). La medición de biomarcadores específicos permite reflejar el tiempo transcurrido de una lesión y proporciona información sobre los mecanismos moleculares de la toxicidad y además provee de manera confiable un diagnóstico preciso sobre el estresor ambiental estudiado. Además, los biomarcadores pueden emplearse para la detección temprana de una enfermedad, y esa información ayuda a evitar una mayor exposición al estresor ambiental así como un desarrollo estratégico de un tratamiento o remediación (Figura 4) (Gupta 2014).

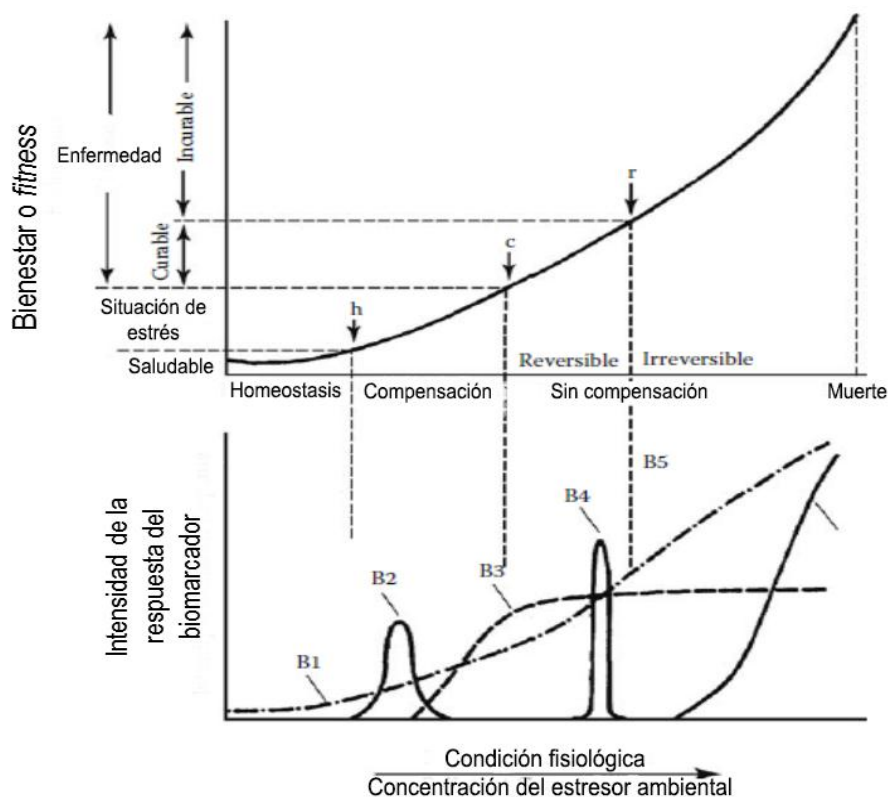


Figura 4. Representación del concepto de biomarcadores mostrando la relación de la exposición al estresor ambiental, el estado de salud y la respuesta de los biomarcadores. La curva superior representa la progresión del estado de salud de un

individuo conforme aumenta la exposición a un determinado estresor ambiental. H, es el punto en el cual se aparta del rango inicial de respuesta homeostática normal; c, es el límite en el cual las respuestas compensatorias pueden prevenir el desarrollo de la enfermedad; r, es el límite más allá del cual el daño patológico es irreversible por los mecanismos de reparación. El gráfico inferior muestra la respuesta de cinco hipotéticos biomarcadores (B) diferentes utilizados para evaluar la salud de un individuo. Modificado de Walker y col. (2009).

En el campo de la toxicología, los biomarcadores han sido clasificados en diferentes tipos según sean marcadores de exposición, efecto y susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición se definen como cualquier sustancia extraña o sus metabolitos, que ingresan en un organismo e indican la exposición del organismo al factor de estrés; los *biomarcadores de efecto* de manera general indican que el factor de estrés está actuando en su sitio de acción, y de manera específica, indican alguna alteración bioquímica, fisiológica o genética que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidos como un daño o como una patología potencial o ya establecida; y los *biomarcadores de susceptibilidad* son indicadores de la sensibilidad individual, de la capacidad heredada genéticamente o adquirida de un organismo, para responder a la exposición a una sustancia que produce estrés. Los biomarcadores pueden o no ser específicos (Gupta 2014).

En este contexto, como los biomarcadores son considerados señales de alerta temprana, frente a la exposición a los estresores ambientales antes que el daño sea irreversible, y que proveen pruebas de la perturbación en los ecosistemas, se han propuesto como importantes herramientas que contribuyen a fundamentar la toma de decisiones para la gestión y protección ambiental (Walker 2009, Gupta 2014, Newman 2014).

1.4.2. La importancia de la correlación de biomarcadores en los diferentes niveles de organización

El uso de *biomarcadores* evaluados a diferentes niveles de organización biológica permite conocer cuando ha ocurrido un evento de exposición a un estresor ambiental particular y el tipo de respuestas biológicas por la acción del estresor en su sitio diana; en este sentido, pueden ser utilizados como importantes herramientas ecotoxicológicas para evaluar estos efectos biológicos en una cascada de niveles de organización (Figura 5). Todas las respuestas biológicas comienzan luego de la interacción de estresor con las biomoléculas en su sitio o célula diana; y por este motivo, al evaluar los efectos tóxicos producidos desde el nivel molecular y citogenético hasta niveles de organización superiores, se puede obtener información valiosa que permita hacer inferencias de niveles de organización bajos hacia más altos (Van der Oost y col. 2003, Newman 2014). Varios autores postulan que a partir de las correlaciones de las respuestas obtenidas a diferentes niveles de organización se podrán realizar posteriormente las evaluaciones de riesgo ambiental adecuadas (Van der Oost y col. 2003, Venturino y col. 2003).

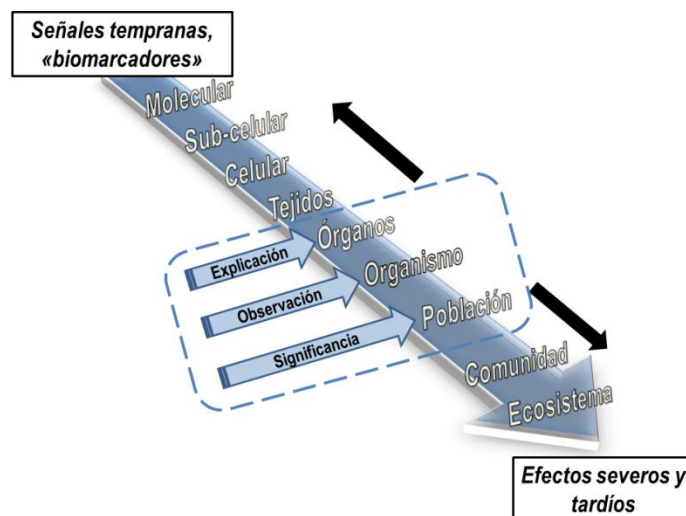


Figura 5. Esquema de la concatenación o cascada “explicación-observación-significancia” para niveles adyacentes y que puede aplicarse para cualquier nivel dentro de la estructura jerárquica. Modificado de Newman y Clements (2008).

Específicamente, al evaluar los efectos subletales de los estresores ambientales en anfibios es necesario aplicar diferentes biomarcadores en los niveles molecular, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, como herramientas que aporten información precisa durante el ciclo de vida completo de los anfibios, y esto proveerá una mayor comprensión sobre los efectos de estos estresores en la disminución en las poblaciones de anfibios (Venturino y col. 2003, Sparling y col. 2010, Connon y col. 2012).

Los resultados que se refieren a los niveles inferiores de la jerarquía conceptual, como los efectos bioquímicos, tienden a ser más manejables y tienen más posibilidades de vincularse fácilmente a una causa específica que los efectos a niveles superiores como la biosfera. En los procesos biológicos los efectos a niveles jerárquicos superiores siempre están precedidos por cambios tempranos en escalas jerárquicas inferiores (niveles bioquímicos y genéticos) y en este sentido, el empleo de diferentes biomarcadores en escalas jerárquicas inferiores permite que sean utilizados como señales de alerta temprana para conocer e inferir respuestas a niveles superiores antes que ocurran daños irreversibles (Van der Oost y col. 2003, Newman 2014). Es importante además mencionar que todos los niveles de organización son igualmente importantes de evaluar ya que contribuyen de manera diferente a ahorrar esfuerzos y a mejorar nuestra comprensión sobre los estresores ambientales; y además es importante hacer una integración de nuestra información colectiva sobre el destino y los efectos de estos compuestos a todos los niveles, para dar un cuerpo coherente y consistente al conocimiento (Newman y Clements 2008).

En otro contexto medioambiental, los biomarcadores se presentan como prometedores indicadores sensibles, que demuestran que los estresores ambientales han ingresado en los organismos, se han distribuido entre los tejidos y están provocando efectos adversos en las células diana (Van der Oost y col. 2003, Newman 2014). En este sentido, la aplicación

de una variedad de biomarcadores en la ecotoxicología predictiva, mejorará la interpretación de los efectos y ayudará a asegurar su importancia en la evaluación del impacto, porque se consideran herramientas importantes que ayudan a apoyar la toma de decisiones para la gestión ambiental, antes de que se produzca daño irreversible en el ecosistema (Venturino y col. 2003, Sparling y col. 2010, Ossana y col. 2013, Josende y col. 2015).

1.4.3. Los biomarcadores en especies bioindicadoras como herramientas de diagnóstico ambiental

Las especies bioindicadoras, también conocidos como bioindicadores, son organismos o comunidades de organismos, cuyas respuestas se utilizan de forma representativa para evaluar una situación, dando pistas sobre la condición de todo el ecosistema (Gerhardt 2002). Sin embargo, una definición general e integral de un bioindicador sería: una especie o grupo de especies que refleja fácilmente el estado abiótico o biótico de un medio ambiente y que representa el impacto del cambio ambiental en un hábitat, comunidad o ecosistema (Gerhardt 2002). Los bioindicadores son útiles en tres situaciones: 1) cuando el estresor ambiental indicado no se puede medir (por ejemplo, en situaciones donde los estresores ambientales en el pasado se reconstruyeron, como el cambio climático estudiado con paleo-biomonitoreo), 2) donde el estresor indicado es difícil de medir (por ejemplo, pesticidas y sus residuos o efluentes tóxicos complejos que contienen varios productos químicos que interactúan) y 3) donde el estresor ambiental es fácil de medir pero difícil de interpretar (por ejemplo, para detectar si los cambios observados tienen importancia ecológica) (Gerhardt 2002).

El concepto de biomarcador, definido anteriormente, puede aplicarse en especies bioindicadoras y dicha combinación resulta en una excelente herramienta de diagnóstico ambiental, cuyo fin ayudará a demostrar la magnitud de la respuesta en estos organismos bioindicadores de prueba frente un factor de estrés ambiental y de esta manera, ser útiles como señales de alerta temprana (Adams y Ham 2011, Hamza-Chaffai 2014). En conclusión, los métodos generales de biomonitoreo (uso de organismos para monitorear ambientes contaminados que implican evaluar posibles efectos sobre la biota o inclusive para humanos), y la aplicación de biomarcadores (cambios celulares, de tejidos, fluidos corporales, fisiológicos o bioquímicos en individuos, que se usan cuantitativamente durante biomonitoreos utilizados para detectar la presencia de estresores significativos o como señales de alerta temprana para efectos adversos inminentes), son también considerados como tecnologías importantes desarrolladas en las últimas décadas (Newman 2014). En definitiva, el uso de herramientas ecotoxicológicas predictivas como los biomarcadores a diferentes niveles de organización, permite vincular la exposición con las respuestas, y dichas respuestas biológicas evaluadas en especies bioindicadoras como los anuros pueden ser útiles en la evaluación del riesgo ambiental si son validadas en el campo (Venturino y col. 2003).

1.4.4. Bioensayos como herramienta para evaluar biomarcadores

Sumado a lo expuesto anteriormente, actualmente para evaluar las respuestas de biomarcadores resulta fundamental aplicar y desarrollar bioensayos sensibles de laboratorio que son herramientas validadas para estudios de ecotoxicología (Van der Oost y col. 2003). Los ensayos biológicos o *bioensayos* son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Lewis y col. 1994, USEPA 2002b). Este concepto de bioensayo que deriva de la toxicología clásica, ha sido modificado, adaptado y extendido al diagnóstico y manejo ambiental dentro del campo de la Ecotoxicología y junto a los análisis fisicoquímicos convencionales, los ensayos de toxicidad son considerados como una alternativa eficaz en la predicción de niveles seguros de concentración de compuestos tóxicos. Específicamente, los bioensayos de toxicidad son potentes herramientas que poseen ventajas sobre las clásicas pruebas químicas y físicas, ya que no sólo permiten evaluar la calidad del agua sino también estimar las concentraciones de los contaminantes que causan potenciales efectos adversos sobre la biota acuática (Lewis y col. 1994, USEPA 2002b). Este uso de los bioensayos permite considerarlos herramientas bioanalíticas, siendo importante utilizar metodologías estandarizadas con especies validadas por comparación de resultados tanto intra- como inter-laboratorios. La finalidad de estas metodologías es maximizar la reproducibilidad y confiabilidad de los datos obtenidos (Buikema y col. 1982). Teniendo en cuenta la duración de los efectos medidos en estos bioensayos, los mismos pueden clasificarse en dos grandes categorías: agudos y crónicos. Un efecto agudo involucra un estímulo lo suficientemente severo para inducir una respuesta rápida, mientras que un efecto crónico involucra un estímulo que permanece o continúa por períodos prolongados de al menos la décima parte del ciclo de vida (Lewis y col. 1994, USEPA 2002b).

Los bioensayos ofrecen muchas ventajas para comparar la toxicidad relativa de estresores ambientales específicos o efluentes específicos, pero también tienen serias limitaciones para el monitoreo biológico, porque en la mayoría de los bioensayos, en especial en aquellos de toxicidad aguda, no se tiene en cuenta el efecto de la partición química en el medioambiente, la cinética y absorción de los productos químicos a los sedimentos, la acumulación a través de las cadenas alimentarias y los modos de acción tóxica, dado que en algunas circunstancias este tipo de bioensayos son realizados solamente con una única especie, en una etapa de su ciclo de vida, frente a un solo compuesto puro, bajo condiciones controladas de laboratorio, presentando sus resultados una relevancia ecológica limitada (Burkhardt y col. 2003, Van der Oost y col. 2003). A pesar de estas restricciones para realizar extrapolaciones a escala ambiental, son los resultados provenientes de los bioensayos, los que constituyen las fuentes de información predominantes para la evaluación ecológica de los efectos de los estresores ambientales (Castillo Morales 2004, Sánchez-Bain y col. 2004). En definitiva, asociando el uso de biomarcadores con los beneficios de los bioensayos como un intento de vincular las respuestas biológicas a los efectos de los estresores ambientales sobre las diferentes características de la especie modelo,

se proporciona una base para el uso de estas dos herramientas en la evaluación ambiental (Van der Oost y col. 2003, Castillo Morales 2004, Sánchez-Bain y col. 2004).

Para el caso de los anfibios, a partir de 1980 se publicaron inicialmente las guías para bioensayos estandarizados por parte de la Asociación Internacional para el Ensayo y Materiales (mundialmente conocida como ASTM) que fueron fundamentales para preparar el terreno en el desarrollo de herramientas para la evaluación de la toxicidad. Al mismo tiempo, los esfuerzos metodológicos de Dumont y col. (1983) en sus investigaciones con *X. laevis* para desarrollar pruebas de detección que pudieran utilizarse para indicar los efectos de las aguas contaminadas en el proceso de extracción de petróleo y gas, así como las mezclas complejas asociadas con esa extracción (Bantle et al., 1994; Dumont et al., 1983; Gaudet-Hull et al., 1994); los llevó a desarrollar en última instancia el protocolo de bioensayo denominado *Ensayo de Teratogénesis con Embriones de Rana-Xenopus* también conocido como FETAX (*Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus*) (Sparling y col. 2010). En el caso de Argentina, como fue mencionado anteriormente, se desarrolla el protocolo AMPHITOX para estudios ecotoxicológicos estandarizados con embriones de anfibios para evaluar muestras ambientales utilizando la especie local *R. arenarum* (Herkovits y col. 2002, Herkovits y Perez-Coll 2003). A pesar de estos avances, los anfibios no fueron considerados como especies modelos para test de toxicidad en los programas de acción para el agua limpia (Sparling y col. 2010). A partir del año 2005, los investigadores han incorporado a los bioensayos situaciones de exposición más reales a sus experimentos; por ejemplo utilizando especies nativas, focalizándose en los diferentes hábitos de vida de los anuros y sus tasas de desarrollo, incorporando en sus estudios la variación genética de los organismos y especies ensayadas, incrementando la escala espacial en sus estudios, examinando el efecto directo e indirecto de los estresores ambientales, y hasta explorando las conexiones de aquellos estresores que son potencialmente disruptivos y afectan adversamente las poblaciones y la estructura de la comunidad de anuros en el mesocosmos (Sparling y col. 2010). Los estudios contemporáneos se están alejando de los enfoques de una especie única y de evaluaciones simples de los estresores, que dominaron las primeras investigaciones en la ecotoxicología de la herpetofauna, y van más allá estudiando el ingreso de los estresores en los hábitats acuáticos, entendiendo que son críticos para la sostenibilidad a largo plazo de las poblaciones de anfibios, y optan por un enfoque de estrés múltiple sobre de las poblaciones de anfibios que puede ser más beneficioso para la sostenibilidad a largo plazo (Sparling y col. 2010).

1.4.5. Biomarcadores de uso convencional en ecotoxicología de anfibios

La lista de parámetros de respuestas biológicas en anfibios que puede evaluarse en bioensayos de laboratorios, como posibles biomarcadores, es extensa y dependerá del objetivo de estudio (Sparling y col. 2010). Por ejemplo, la mortalidad y el crecimiento de los organismos ensayados son puntos finales a nivel individual comunes que pueden usarse con la mayoría de las especies de bioensayos; mientras que puntos finales individuales más específicos para los anfibios

incluyen la longitud del período larval y el tamaño hasta la metamorfosis (Sparling y col. 2010). En las revisiones de trabajos sobre ecotoxicología de anuros se destaca que principalmente la mayoría de los estudios de mortalidad se enfoca en el cálculo de valores de CL50 de un contaminante específico (CL50 es la concentración letal que mata a 50 % de una población) y evaluado en una especie. No obstante, aunque el análisis de los valores de CL50 probablemente influya en el impacto real de los estresores ambientales sobre los anfibios en entornos naturales, es esencial disponer de más información sobre el impacto de las concentraciones ecológicamente relevantes sobre la supervivencia y en los efectos subletales, para determinar adecuadamente la sensibilidad de los anfibios frente a un evento de estrés químico por plaguicidas, por ejemplo (Egea-Serrano y col. 2012). Por otro lado, las alteraciones morfológicas y del crecimiento normal en anuros son los biomarcadores de exposición a plaguicidas a nivel individual más frecuentemente evaluados en estudios ecotoxicológicos; y en este sentido, los investigadores han mencionado que estos biomarcadores deben asociarse a estudios a nivel genético del desarrollo embrionario dado que los diferentes estresores ambientales pueden afectar los factores de transcripción que regulan la expresión génica, alterando la cascada de respuestas, y entonces estudiar este tipo de respuestas es altamente prometedor para entender los mecanismos de acción de un plaguicida (Venturino y col. 2003).

Esta situación, y la ayuda de las mejoras tecnológicas, ha llevado a los ecotoxicólogos y herpetólogos a la búsqueda de nuevas metodologías y herramientas que sean útiles como biomarcadores moleculares (y genéticos), bioquímicos y fisiológicos (incluyendo histológicos) y que permiten detectar los efectos subletales en anfibios (Venturino y col. 2003, Newman 2014). En este contexto, la integración de biomarcadores puede servir para evaluar el estado de salud de las poblaciones de anfibios actuando como puntos finales subletales de intoxicación (Venturino y col. 2003).

Sumado a esto, los ecotoxicólogos locales han planteado la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores, utilizando especies autóctonas para evaluar problemas ambientales locales y especialmente destacando que en anuros es necesario utilizar herramientas que provean información certera, en diferentes estadios del desarrollo, al evaluar efectos subletales de estresores ambientales a diferentes niveles ecotoxicológicos antes que los daños en la biota sean irreversibles (Venturino y col. 2003, Venturino y Pechen de D'Angelo 2005).

1.4.5.1. Biomarcadores a nivel de individuo

La ecotoxicología orgánica o individual investiga los efectos tóxicos para los individuos y, cuando es posible, los relaciona con los efectos a las poblaciones y comunidades. Tales investigaciones han sido el centro de los estudios en la ecotoxicología y sus disciplinas predecesoras (ecotoxicología acuática, a campo o *wildlife ecotoxicology* y ecotoxicología ambiental) desde sus inicios. Los ecotoxicólogos han tomado de la base de conocimiento mecanicista de la toxicología clásica, un campo centrado en los individuos. Este conocimiento es directamente útil para especies carismáticas, en peligro

de extinción o amenazadas que están protegidas dado que ayuda en la toma de decisiones sobre estas especies en particular e influye sobre las prohibiciones sobre los estresores ambientales que amenazan sus poblaciones. Focalizándonos en el concepto de biomarcadores a diferentes niveles, proporciona una base firme en un nivel de organización biológica desde la cual ampliar la visión científica hacia arriba o abajo en la escala (Newman y Clements 2008).

Los efectos documentados de los contaminantes o estresores ambientales a nivel individual en los anfibios varían de efectos letales a efectos subletales incluyendo disminución del crecimiento y desarrollo y aumento de la frecuencia de anomalías del desarrollo, susceptibilidad a enfermedades y alteraciones del comportamiento (Egea-Serrano y col. 2012). Los estudios de meta-análisis han resumido los efectos letales y subletales de los plaguicidas en anfibios focalizándose en evaluar los efectos en el crecimiento y comportamiento. Dichos estudios, muestran una amplia variedad de resultados siendo uno de los principales la disminución de la supervivencia de los anfibios a concentraciones relevantes de los plaguicidas una vez que los efectos subletales individuales son detectados (Egea-Serrano y col. 2012, Baker y col. 2013, Morínigo Egusquiza 2016, Shuman-Goodier y Propper 2016). Otros efectos subletales en anfibios registrados como puntos finales por los investigadores, han sido el tiempo de la metamorfosis o de eclosión y la frecuencia de anormalidades cuyos resultados varían desde efectos adversos leves hasta severos (Sparling y col. 2010, Egea-Serrano y col. 2012, Shuman-Goodier y Propper 2016).

Específicamente, los meta-análisis destacan que la mayor parte de los estudios ecotoxicológicos evaluaron mortalidad como punto final letal (aproximadamente un 30%), seguido de estudios subletales sobre el desarrollo y metamorfosis (aproximadamente un 20%). Posteriormente, cantidad significativa de los estudios evaluaron efectos de anormalidades (aproximadamente un 15%), principalmente en condiciones de laboratorio, debido a la dificultad de realizarlos en condiciones de campo y por lo general están limitados a estados larvales (Mann y col. 2009, Sparling y col. 2010, Egea-Serrano y col. 2012, Morínigo Egusquiza 2016).

Con respecto a las anormalidades morfológicas evaluadas en anfibios, es bien sabido que los estresores ambientales son una amenaza importante para estos organismos, dado que se ha comprobado que hay grandes aumentos en la frecuencia de las anormalidades, teniendo consecuencias en la supervivencia; y tales efectos pueden explicar el vínculo entre los factores estresantes ambientales y la disminución de población descrita en varias áreas alrededor del mundo (Meteyer 2000, Lannoo 2008, Egea-Serrano y col. 2012). Los estudios que evalúan los efectos comportamentales son frecuentes, y han cobrado mucho interés en anuros (aproximadamente un 10%) dado que estos parámetros son indicadores específicos de toxicidad subletal y señales de alerta temprana porque son altamente sensibles, económicos, no invasivos y representan un eslabón esencial entre los procesos fisiológicos y ecológicos (Shuman-Goodier y Propper

2016). Su fundamentación radica en que los anuros que presentan alteraciones en el comportamiento, frecuentemente ven afectadas y comprometidas funciones como la alimentación, la velocidad de natación o inclusive el cortejo; y tales características se relacionan directamente con la supervivencia y la aptitud física o *fitness* en el ambiente natural. Entonces, demostrar la importancia de los efectos de la exposición a los plaguicidas en el comportamiento sobre estos vertebrados acuáticos, permite evidenciar futuras consecuencias sobre las poblaciones y la dinámica de las comunidades acuáticas porque los cambios de comportamiento también producen efectos indirectos en toda la estructura comunitaria alterando las interacciones de especies, lo cual termina desencadenando alteraciones en el normal funcionamiento en la cadenas tróficas (Amiard-Triquet 2009, Denoël y col. 2012, Shuman-Goodier y Propper 2016).

En este sentido, algunas de las principales respuestas comportamentales evaluadas en anuros han considerado los efectos adversos sobre forrajeo, hiperactividad, narcosis, natación acelerada y parálisis, entre otras (Sparling y col. 2000, 2010, Denoël 2012). Actualmente, con el desarrollo de nuevos programas informáticos y dispositivos digitales, las evaluaciones de comportamiento en larvas de anuros se han sofisticado llegando a ser mensurables de una manera precisa y cuantitativa (Liu 2011, Peltzer y col. 2013a). Particularmente en Argentina, varios trabajos han demostrado el impacto de los plaguicidas focalizados en el nivel individual utilizando especies locales (Salibián 1992, Ferrari y col. 2005, Peltzer y col. 2008, Agostini y col. 2009, 2010, Brodeur y col. 2009, Vera Candioti y col. 2010, Aronzon y col. 2011, Lajmanovich y col. 2012, Ruiz de Arcaute y col. 2012, Peltzer y col. 2013a).

Finalmente, Newman y Clements (2008) destacan que aunque hay un sesgo en la investigación ecotoxicológica hacia evaluar los efectos a nivel individual, esto resulta en consecuencias positivas porque entre otras cosas permite evaluar rápidamente la inclusión de nuevas tecnologías a la ecotoxicología, provee explicaciones de mecanismos de acción para los efectos observados en los niveles superiores de organización, son indicadores sensibles de exposición o efecto frente a la presencia de un estresor ambiental y ofrecen un enfoque altamente discreto y manejable para cualquier pregunta ecotoxicológica. No obstante, los autores señalan que debe haber una cuidadosa interpretación de los datos a nivel individual conforme aumenta nuestra capacidad de predecir las consecuencias en la población y, a veces, en los niveles superiores de organización como a nivel comunidad. En ese sentido, destacan que es necesario integrar con otro tipo de información, como por ejemplo los datos de bioacumulación, lo que ayudará a mejorar nuestra capacidad para predecir la transferencia trófica de los estresores ambientales en las cadenas alimenticias (Newman y Clements 2008).

1.4.5.2. Biomarcadores a nivel histológico

La histopatología es la ciencia que se focaliza en los cambios celulares y de los tejidos como resultado de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Newman y Clements 2008). En el último tiempo, se ha retornado el interés por

la histología en la ecotoxicología y se ha estudiado la importancia de la histología en la fisiología como indicadores sensibles y fiables del estado de salud en especies de vertebrados acuáticos, principalmente por su rol de detoxificación y hemocatéresis (Newman 2014, Murussi y col. 2015). Algunos estudios destacan que los plaguicidas pueden ocasionar alteraciones histológicas en el hígado como degeneración lipídica, procesos necróticos multifocales e infiltración de leucocitos que en última instancia pueden desencadenar cáncer en algunos casos, afectando de esta manera el bienestar del organismo (Murussi y col. 2015). En este contexto, estos biomarcadores se pueden utilizar como un sistema de alerta temprana, para los efectos potenciales a nivel individual y a veces de la población. En este sentido, el análisis de biomarcadores histológicos puede proporcionar nueva información, sobre el estudio del cambio en las células y tejidos, asociados con enfermedades o la exposición a un estresor ambiental (Newman 2014). No obstante, se ha mencionado que existen dos deficiencias de los biomarcadores histopatológicos a mejorar y ambas limitaciones están siendo superadas lentamente por una ciencia que adopta otros paradigmas de análisis como por ejemplo el cambio en el énfasis en los métodos cuantitativos. La primera limitación se encuentra en determinar los parámetros histológicos normales y sus variaciones según la estación, la dieta, el ciclo reproductivo y otros procesos que pueden llevar a resultados malinterpretados en las especies utilizadas como bioindicadoras. La segunda limitante es que, aunque existen métodos para cuantificar los efectos rutinariamente, la mayoría de los estudios histológicos son de naturaleza cualitativa y resulta indispensable cuantificar estos resultados para estimaciones ecotoxicológicas (Newman 2014).

Principalmente debido a su papel en la detoxificación y homeostasis, el hígado y los riñones suelen ser órganos diana que pueden acumular estresores ambientales, también estos órganos pueden sufrir alteraciones en sus actividades enzimáticas, y/o sufrir daño histopatológico de forma leve (por ejemplo, inflamación) o grave (por ejemplo, necrosis) (Marques y col. 2009). En este sentido, con algunos métodos histoquímicos para la localización de tejidos con cambios bioquímicos también se puede obtener información valiosa relativa a la exposición en órganos o sitios diana y estos hallazgos pueden estar relacionados con resultados que indican una alta incidencia de cáncer en algunos tejidos afectados por los estresores ambientales en los organismos (Newman 2014). Un ejemplo claro de esto se ha demostrado en las células con función fagocítica presentes en el hígado, bazo y riñón de vertebrados acuáticos. Varios estudios histológicos han detectado la presencia de estas células fagocíticas denominadas melanomacrófagos (MMCs) en vertebrados acuáticos, relacionándolas inclusive a las células de Browicz-Kupffer de mamíferos, cuyas funciones están estrechamente relacionadas a respuestas fisiológicas e inmunológicas, llegando a demostrarse que en órganos como hígado, bazo y riñón son células fagocíticas agresivas que consumen fácilmente hongos, bacterias, parásitos, micobacterias o cuerpos extraños; participan en funciones de detoxificación; y están involucradas en la hemocatéresis por fagocitosis de desechos celulares incluyendo productos de descomposición de hemoglobina (Rund y col. 1998, Agius 1981, Sichel y col. 2002, Agius y Roberts 2003, Franco-Belussi y col. 2013, Campbell 2015). La particular función de los MMCs radica en que estas células

producen y almacenan tres pigmentos: melanina, hemosiderina y lipofuscina (Agius 1981, Agius y Roberts 2003, Jordanova y col. 2008). La melanina puede absorber y neutralizar radicales libres y otras sustancias derivadas del metabolismo celular (Agius y Roberts 2003). Los MMCs además pueden sintetizar melanina, que es un pigmento protector capaz de eliminar radicales libres y neutralizar cationes, protegiendo así los tejidos de los daños citotóxicos (Barni y col. 1999, Campbell 2015). La lipofuscina se produce a través de la polimerización oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados que se acumulan como resultado de una pobre nutrición (Pickford 1953). Por último, la hemosiderina es un producto metabólico intermedio, generado durante el reciclado de componentes en la eritropoyesis (Kranz 1989). En este sentido, los estudios en anuros han destacado la importancia de los MMCs para regular procesos naturales en anfibios como la hibernación (Barni y col. 1999), la época reproductiva (Moresco y De Oliveira 2009), el estrés térmico (Santos y col. 2014) y situaciones de hipoxia (Frangioni y col. 2000), entre otras. En los últimos años, ha habido un interés creciente en el posible papel de la melanina en MMCs como pigmento protector frente a radicales libres y otras sustancias tóxicas luego de la exposición a estresores ambientales como plaguicidas, metales pesados o inclusive por hormonas exógenas (Loumbourdis y Vogiatzis 2002, Fenoglio y col. 2005, Franco-Belussi y col. 2013). Sumado a esto, el análisis de los daños histopatológicos en el hígado causados por los pesticidas puede revelar alteraciones en la función de detoxificadora de este importante órgano y al relacionarse con los análisis en los MMCs, se logra tener una visión integral sobre el rol del hígado en la detoxificación de estresores ambientales (Fenoglio y col. 2005, Çakici 2015).

1.4.5.3. Biomarcadores a nivel bioquímico

Los cambios a nivel bioquímico generalmente son detectables antes de que se observen efectos adversos en niveles más altos de organización biológica y es por eso que el enfoque de los biomarcadores bioquímicos se aplica a menudo como una herramienta de alerta temprana (Newman 2014). Ésta es una gran ventaja porque las respuestas a niveles más altos, como el ecosistema, generalmente son medibles sólo después de que se hayan producido daños significativos o permanentes, y por eso se deduce que tanto los biomarcadores bioquímicos como los genéticos-moleculares también son herramientas diagnósticas útiles para monitorear la recuperación de un sitio contaminado a un estado normal después que la descarga del estresor al ambiente ha cesado (Newman 2014). Además, al comprender los mecanismos bioquímicos, podemos predecir mejor los efectos de estresores ambientales no evaluados basados en su similitud de modo bioquímico de acción con los contaminantes bien conocidos y, si hay varios estresores presentes en el ambiente, los cambios bioquímicos específicos pueden proporcionar pistas valiosas sobre qué contaminante está ejerciendo el efecto (Guilherme y col. 2014, Guzmán-Guillén y col. 2014, Newman 2014). Por lo tanto, la comprensión del modo de acción bioquímico de un plaguicida, por ejemplo, mejora nuestro conocimiento sobre el mecanismo de acción y nuestra capacidad de predecir los efectos en los niveles más altos de la organización biológica (Newman 2014). En este

sentido, en Argentina varios autores han dedicado sus investigaciones a evaluar el efecto de los plaguicidas a nivel bioquímico en anuros, e inclusive destacándolos como importantes biomarcadores para evaluaciones de riesgo (Venturino y col. 2001b, Ferrari y col. 2004, Venturino y Pechen de D'Angelo 2005, Attademo y col. 2007, Venturino y col. 2007, Anguiano y col. 2008, Ferrari y col. 2008, Attademo y col. 2011, Lascano y col. 2011, Brodeur y col. 2012, Lajmanovich y col. 2012, Rosenbaum y col. 2012).

1.5. Biomarcadores de cito y genotoxicidad

1.5.1. Generalidades sobre cito y genotoxicidad

Se define a la *genotoxicidad* como el daño producido por un agente físico o químico sobre el material genético alterando su estructura normal ya sea en los cromosomas o en el ADN. Por otro lado, se define como *citotoxicidad* a los efectos tóxicos que causan daño y muerte celular detectable en un tejido u órgano diana (Mudry y Carballo 2006, Newman 2014). En ese sentido, la ecotoxicología genética es definida como el estudio de los cambios genéticos inducidos por los contaminantes en los organismos o el estudio de los cambios inducidos por sustancias químicas o radiación en el material genético de la biota natural, incluyendo alteraciones directas en los genes y la expresión génica o efectos selectivos de contaminantes en las frecuencias genéticas (Depledge 1996, 1998). Los estresores ambientales pueden afectar la genética de las poblaciones naturales de dos maneras: la variabilidad genética se incrementa por la aparición de nuevas mutaciones o la variabilidad genética general se reduce por los cuellos de botella de la población. Asimismo, cualquiera de estos efectos puede ir acompañado de alteraciones en las frecuencias de los alelos como resultado de la selección en *loci* importantes para la supervivencia en entornos contaminados o de la fijación de alelos deletéreos (Bickham y col. 2000). Particularmente, el efecto de los estresores ambientales y sus metabolitos pueden ser discutidos en relación con la genotoxicidad, debido a que estos agentes cuando actúan como radicales libres pueden producir roturas en una o ambas cadenas de la molécula de ADN, pueden oxidar bases, o bien pueden unirse covalentemente a una base o, menos frecuentemente, a otra porción de la molécula de ADN para formar un aducto (Newman 2014).

Considerando la posibilidad de conocer los modos de acción de los estresores ambientales sobre los mecanismos genéticos, los ecotoxicólogos han planteado la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores con mayor sensibilidad y precisión que proporcionen una rápida y mejor información después de un evento de exposición a la acción de los factores estresantes en los ambientes naturales (Jha 2008). Se ha propuesto, considerando el continuo existente desde poblaciones, individuos y genes, que una interrupción del equilibrio genético en cualquiera de estos niveles, tiene una influencia directa en el declive de la biodiversidad, el aumento subsiguiente de la vulnerabilidad al estrés ambiental y hasta la extinción de las especies (Bickham y col. 2000, Jha 2008). En este sentido, varios autores destacan que el uso de

biomarcadores a nivel citogenético permite detectar respuestas tempranas en vertebrados acuáticos expuestos a bajas concentraciones ambientales de agroquímicos, que además permiten conectar fácilmente efectos a niveles superiores (Bickham y col. 2000, Barni y col. 2007, Frenzilli y col. 2009). A pesar de esto, para reflejar con precisión un efecto o respuesta ecológicamente significativa como la riqueza de especies o el bienestar reproductivo (*fitness* reproductivo) utilizando biomarcadores genéticos, es necesario asociarlos a las respuestas de otros biomarcadores, con el fin de entender no sólo el modo de acción de un estresor ambiental sino también para ser aplicados como herramientas de diagnóstico (Newman 2014).

En resumen, las células son el sitio de interacción primaria entre los estresores y los sistemas biológicos. Por consiguiente, la comprensión de los efectos genético-moleculares aumenta nuestra capacidad de asociar los efectos a niveles menores con los niveles superiores de organización ecológica; y además permite predecir los efectos de los estresores ambientales que aún no han sido probados sobre la base de interacciones moleculares similares con biomoléculas (Newman 2014). También son altamente recomendables no sólo para evaluar el estado de la salud humana, sino también como biomarcadores para evaluar los efectos en situaciones ambientales naturales por su elevada especificidad según el modo de acción particular del estresor (Bickham y col. 2000, Newman 2014).

1.5.2. Importancia de los estudios de cito y genotoxicidad en ecotoxicología

Actualmente, cientos de pesticidas se utilizan para el control de plagas en diferentes áreas a nivel mundial. A pesar de sus funciones beneficiosas, muchos agroquímicos tienen el potencial de causar alteraciones genéticas en plantas y animales no diana. Tales alteraciones en el genotipo y el fenotipo de un individuo pueden desencadenar alteraciones ecológicas a nivel de población y comunidad (Mohanty y col. 2011). Específicamente, los estresores ambientales influyen y limitan el bienestar de los organismos y sus parámetros en otros niveles de organización, como de la población o comunidad (Figura 6).

En el sentido que se entiende aquí, el bienestar de un individuo está relacionado con atributos tales como su productividad y aptitud reproductiva en relación con su potencial genético (Freedman 1995, Jha 2008). Casi siempre, el rendimiento realizado de un individuo es menor de lo que sería posible bajo condiciones ambientales óptimas. Entonces, fácilmente los biomarcadores citogenéticos pueden demostrar, dependiendo de la intensidad del factor de estrés, alteraciones en el crecimiento y el bienestar de los organismos o incluso evidenciar efectos en la supervivencia (Freedman 1995, Jha 2008). En una visión más general, si consideramos que los individuos pueden mostrar diferencias genéticas en su tolerancia a los estresores, las evaluaciones genéticas pueden mostrar alteraciones en la dinámica evolutiva de las poblaciones y especies (Freedman 1995).

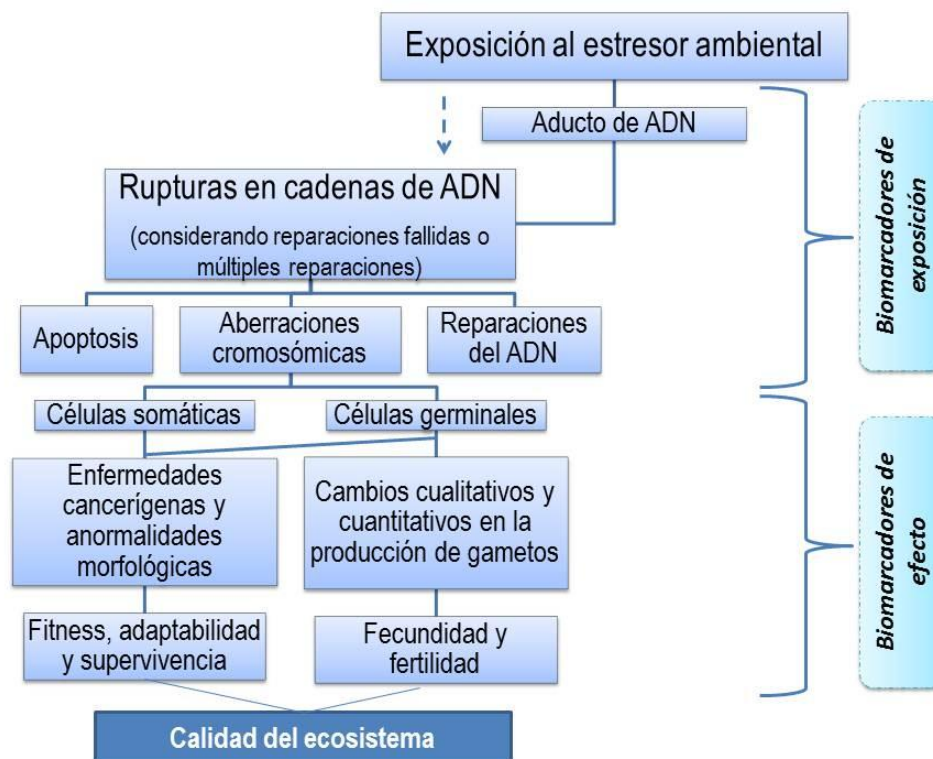


Figura 6. Importancia de las evaluaciones citogenéticas en ecotoxicología. Tomado y modificado de Jha (2008).

1.5.3. Hematología en anfibios para evaluaciones de cito y genotoxicidad

En anfibios, las células sanguíneas maduras tienen tiempos de vida relativamente cortos y por consiguiente, son renovadas continuamente por la diferenciación de células madres en los órganos hematopoyéticos. La región donde se producen las células sanguíneas en anfibios dependerá de la etapa de vida del organismo. Por ejemplo, se conoce que en la etapa embrionaria de anfibios, las primeras células sanguíneas son producidas por células del mesénquima; luego en la etapa larval o de renacuajo las células sanguíneas son producidas por el mesonefro (riñón primitivo) hasta completar la metamorfosis cuando el bazo toma la función y comienza con la producción de nuevas células sanguíneas en juveniles. Finalmente, en los adultos, la gran mayoría de los eritrocitos, leucocitos y trombocitos son producidos en la médula ósea. Es interesante destacar que el desarrollo de la hematopoyesis en anfibios muestra algunas similitudes con lo que ocurre en aves y mamíferos, pero las grandes diferencias según la etapa de vida de los anfibios hace que exista una gran distinción con el resto de los vertebrados (Arikan y Çiçek 2014). Específicamente, la eritropoyesis en anfibios ocurre en los islotes sanguíneos ventrales de embriones, en el hígado y riñón de larvas y juveniles, mientras que en adultos terrestres y acuáticos ocurre no sólo en el hígado y riñón sino que toma lugar en la médula ósea (Figura 7). Cabe destacar que en

fases larvales, el hígado sirve como un órgano de sostén en la eritropoyesis en fases críticas como la metamorfosis y en adultos durante periodos de post-hibernación (McDiarmid y Altig 1999, Arikan y Çiçek 2014;).

En cuanto a la morfología de las células sanguíneas en anfibios, consiste principalmente de eritrocitos (especializadas en el transporte de gases respiratorios como O_2 y CO_2), leucocitos (con funciones relacionadas a la respuesta inmune y la producción de factores de crecimiento hematopoyético) y trombocitos (cuya función está asociada a las plaquetas de mamíferos). Los leucocitos, a su vez, pueden dividirse en granulocitos como los heterófilos, eosinófilos y basófilos, y en agranulocitos, como linfocitos y monocitos (Arikan y Çiçek 2014).

Según varios autores (Barni y col. 2007, Campbell 2015), los estudios de citotoxicidad y genotoxicidad en los eritrocitos de anfibios ha cobrado gran interés debido a las siguientes características:

- 1- los eritrocitos presentan mayor tamaño en comparación a los mamíferos,
- 2- son predominantes en las muestras de sangre en tasas superiores al resto de las células sanguíneas,
- 3- presentan un núcleo de gran tamaño que permite realizar estudios sobre procesos mitóticos y daños en el ADN nuclear y
- 4- son útiles para determinar el estado de salud de anfibios mediante la detección de enfermedades que afectan los componentes celulares y la progresión de esa enfermedad. Por ejemplo, los autores señalan que detectar eritrocitos inmaduros irregulares pueden ser indicativos de un recambio celular rápido o el resultado de factores de estrés ambiental.

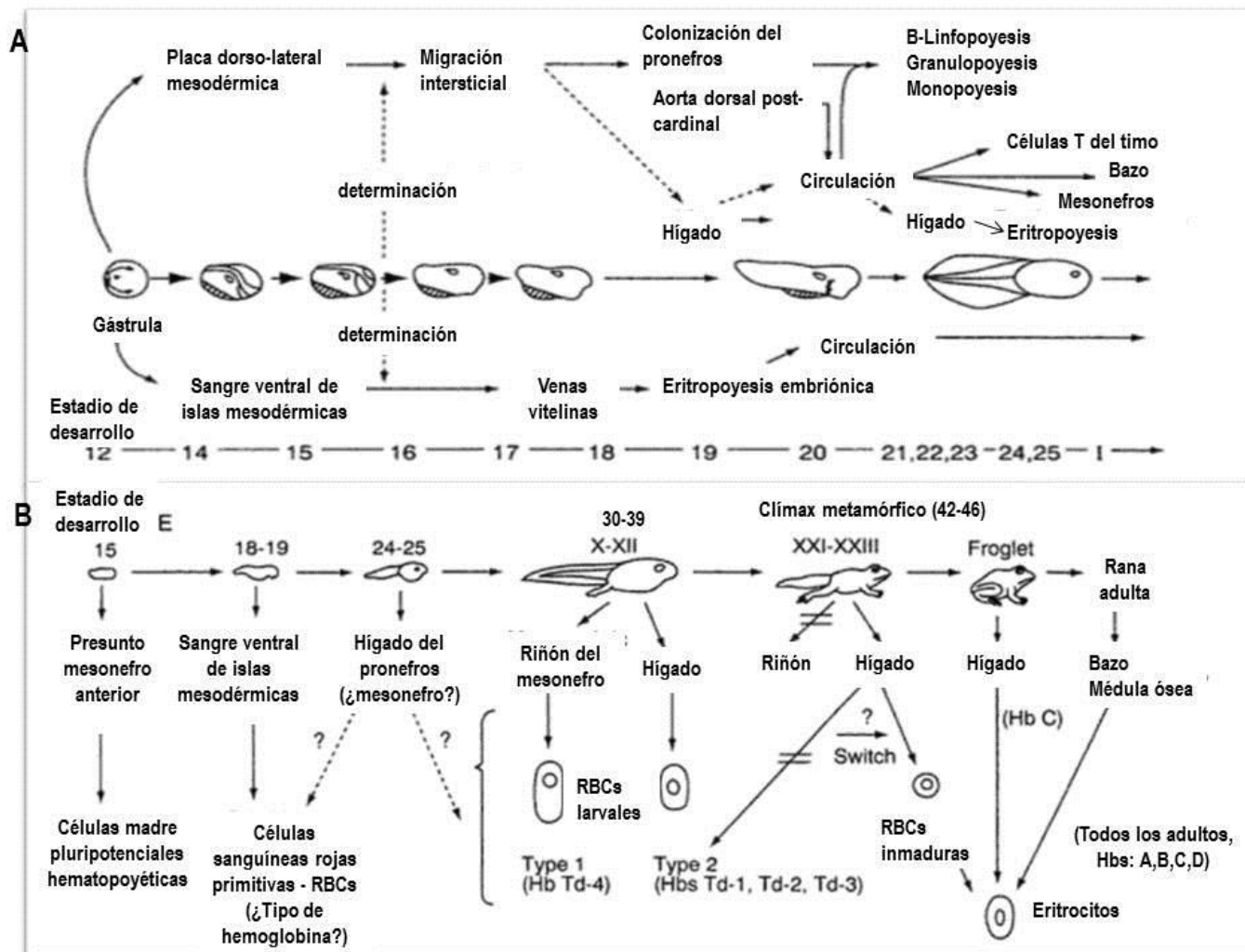


Figura 7. Ontogenia y patrones migratorios de los precusores hematopoyéticos del estadio de desarrollo 12 al 25 (periodo embrionario desde la gástrula hasta la eclosión y estadio I o 25 (comienzo del periodo larval) (A); y de la eritropoyesis y síntesis de hemoglobina en anuros del estadio de desarrollo 15 hasta la rana adulta (B). Tomado y modificado de McDiarmid y Altig (2000).

1.5.4. Ensayos para evaluar cito y genotoxicidad en anfibios

Varios biomarcadores han sido utilizados para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad en organismos acuáticos, entre los que se encuentran los anfibios (Lee y Steinert 2003, Barni y col. 2007, Jha 2008, Vera Candiotti y col. 2010, Lajmanovich y col. 2014, Nikoloff y col. 2014b, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014, Josende y col. 2015). No obstante, los biomarcadores de efecto ampliamente recomendados y utilizados que permiten identificar

alteraciones a nivel del material genético son el ensayo de micronúcleos (MNs) (Barni y col. 2007, Fenech 2007) y el ensayo cometa (EC) o SCGE (Clements y col. 1997, Lee y Steinert 2003, Jha 2008).

El ensayo de MNs, permite detectar macrolesiones inducidas en el ADN celular donde el material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase de la mitosis (Figura 8). Dicho material se observa como un núcleo de menor tamaño que el núcleo principal interfásico el cual recibe el nombre de micronúcleo (Fenech 2007). En definitiva, los MNs son el resultado de lesiones a nivel cromosómico, del ADN e incluso a nivel de proteínas directa o indirectamente involucradas en la segregación cromosómica (por ejemplo, las tubulinas) cuyo origen está relacionado con eventos de pérdidas de fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos luego de una división mitótica (Fenech y Morley 1986). Específicamente, el ensayo de MNs permite evaluar eventos clastogénicos (por aparición de fragmentos acéntricos de cromosomas) o aneugénicos (por cromátidas enteras o cromosomas rezagados que no han sido incorporados en los núcleos hijos al momento de la citocinesis) (Fenech 2007). En este sentido, los MNs requieren de un evento de división celular para expresarse y por este motivo este ensayo es sugerido como un indicador indirecto de daño cromosómico que demuestra un defecto en la capacidad de la célula para dividirse correctamente (Newman 2014). Por otra parte, otras anormalidades nucleares tales como binucleadas (BNs), gemaciones o Buds, núcleos lobulados (NLs), hendiduras nucleares (HNs) y eritroplástidos (EPs) han sido observadas en los eritrocitos de anfibios como consecuencia de la exposición a estresores ambientales con actividad mutagénico y cito- y genotóxica. A pesar de que los mecanismos responsables para la formación de cada tipo de anormalidad nuclear no han sido totalmente explicados, actualmente estas anormalidades nucleares son consideradas como indicadores de daño genético y un complemento al ensayo de MNs al evaluar genotoxicidad (Lajmanovich y col. 2014).

Particularmente, el ensayo de MNs ha sido muy utilizado debido a que posee ciertas ventajas como poder realizar conteos fácilmente en cualquier tejido que se divida, la sencillez para procesamiento, fijación y mantenimiento de la muestra, el bajo costo económico y principalmente debido a que permite evaluar de manera simultánea la inestabilidad cromosómica, el estatus mitótico y la viabilidad celular en una misma célula (Fenech 2007). No obstante, esta técnica tiene limitaciones para su utilidad ya que está restringida a células que atravesaron la primera división mitótica, es útil sólo en células somáticas nucleadas, brinda una estimación indirecta del daño, y los tiempos de análisis son extensos para grandes muestras. Su aceptación generalizada por los investigadores a nivel mundial para evaluar cito- y genotoxicidad, ha resultado en una amplia utilización por los ecotoxicólogos de anfibios de Argentina (Campana y col. 2003, Lajmanovich y col. 2005, Cabagna y col. 2006, Vera Candioti y col. 2010, Bosch y col. 2011, Brodeur y col. 2012, Peltzer y col. 2013b, Lajmanovich y col. 2014, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014).

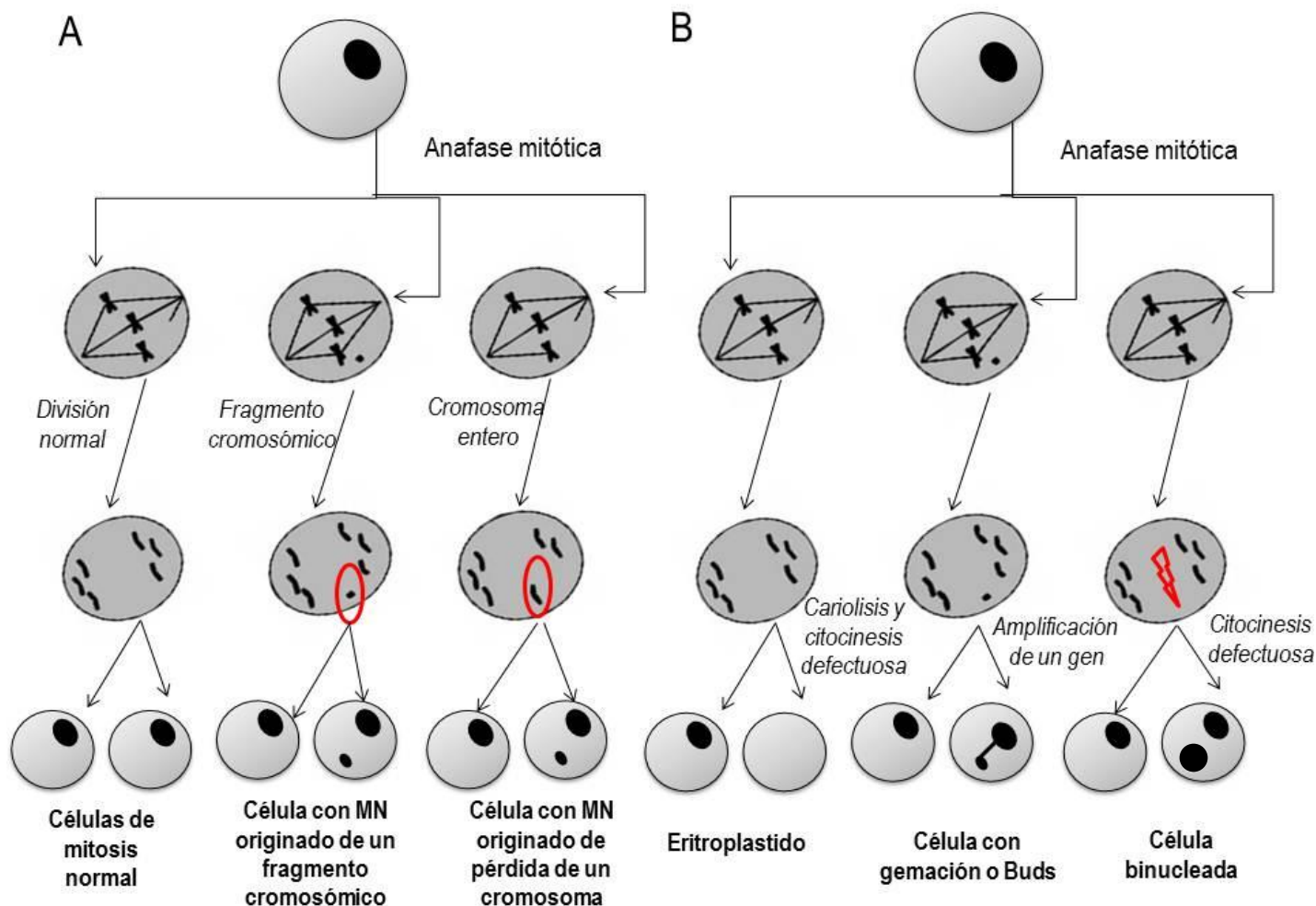


Figura 8. Diagrama de la posible morfogénesis de los micronúcleos (A) y algunas anomalías nucleares en eritrocitos de larvas y adultos de anuros. Modificado de Grazia-Andreassi y col. (2007) esquema de MNs y Migliore y col. (2011) el origen de anomalías nucleares.

Por otro lado, la cantidad de rupturas del ADN también se puede estimar y correlacionar con la exposición a estresores genotóxicos mediante el ensayo de electroforesis en gel de una sola célula (SCGE) o ensayo cometa (EC). Esta metodología ha sido diseñada para la detección de microlesiones directas inducidas en el ADN tales como la ruptura del ADN de simple o doble cadena, sitios álcali lábiles, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación (Singh y col. 1991, Singh 1996, Jha 2008). Esta técnica fue implementada por primera vez por Ostling y Johanson (1984) bajo condiciones de pH neutro, el cual fue una limitante de las utilidades del ensayo ya que solo permitía detectar roturas de cadena doble (Ostling y Johanson 1984). Posteriormente, Singh y col. (1988) introdujeron una variante del procedimiento original en microgeles de agarosa donde la electroforesis se realizaba en condiciones alcalinas, con lo cual además de detectar roturas de cadena simple y doble fue posible cuantificar sitios

sensibles al álcali, uniones cruzadas entre ADN-ADN y ADN-proteína, al igual que rupturas de cadena simple asociadas con mecanismos de reparación ineficientes (Singh y col. 1988). El fundamento de la técnica se basa en que las células de interés son embebidas en un gel de agarosa y colocadas sobre un portaobjetos, luego son lisadas con detergentes y altas concentraciones de sales. Posteriormente, el ADN liberado es sometido a la acción de un campo eléctrico a pH alcalino (Singh y col. 1988). Si existe daño en el ADN, se formarán fragmentos de su molécula que al ser sometidos a una corriente eléctrica, tendrán la capacidad de migrar hacia el ánodo de manera tal que cuanto más corto, en otras palabras, más liviano sea el mismo, mayor la distancia “recorrida” desde el nucleóide al ánodo durante la corrida electroforética. Luego de la correspondiente etapa de deshidratación que evita a los fragmentos de ADN difundirse en el gel, los portaobjetos son teñidos mediante diferentes técnicas que tienen alta afinidad por el ADN como la tinción con bromuro de etidio, DAPI o SybrGreen, entre otros. La visualización al microscopio de fluorescencia presenta a las células con apariencia de cometas con una cabeza en la región nuclear y una cola que contiene los fragmentos de ADN que han migrado en dirección del ánodo. Finalmente, el análisis del daño genético en los nucleóides se puede llevar a cabo mediante el conteo visual de nucleóides normales o dañados según diferentes categorías propuestas por Çavaş y Könen (2007), que permite obtener el índice de daño genético (Pitarque y col. 1999a), o mediante programas de captación de imágenes que permiten cuantificar diferentes variables tales como la cantidad de ADN presente en la cabeza y en cola de cada nucleóide en particular (Pitarque y col. 1999b, Tice y col. 2000, Collins 2004).

En ausencia de aplicaciones adecuadas en los ensayos citogenéticos y citomoleculares, el desarrollo del EC ha revolucionado el campo de la ecotoxicología genética cobrando una gran relevancia por su alta sensibilidad y por ser un ensayo rápido, reproducible y de gran aplicación en diferentes modelos experimentales tanto en sistemas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Las ventajas mencionadas para este ensayo son que permite obtener información del daño inducido a nivel de células individuales, no es necesario trabajar con células en proliferación, es de fácil aplicación y prácticamente en cualquier tipo celular, puede aplicarse tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, estima el daño directo en el momento que ingresa el estresor al organismo, tiene elevada sensibilidad detectando niveles muy bajos de daño en el ADN, se requieren bajas cantidades de células y es relativamente poco el tiempo para la obtención de resultados (Tice y col. 2000, Jha 2008). Es por eso que varios investigadores en todo el mundo han propuesto usar esta herramienta ecotoxicológica para evaluar el efecto de los estresores ambientales en anfibios y su relevancia ecológica (Clements y col. 1997, Ralph y Petras 1998, Lee y Steinert 2003, Marquis y col. 2009, Zhang y col. 2012). Curiosamente, en Argentina esta técnica no había sido aplicada en anfibios, hasta que en 2014, el Dr. Larramendy y col. logran publicar los primeros resultados sobre la temática (Nikoloff y col. 2014b, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014).

Sumado a esto, otra de las ventajas en la utilización del EC es que permite obtener información sobre el modo en que los estresores ambientales producen daño oxidativo en el ADN mediante una modificación de la técnica por la incorporación de enzimas de restricción capaces de reconocer lesiones específicas en la molécula de ADN. Básicamente, el fundamento de esta técnica consiste en que luego de la lisis, los nucleoides contenidos en los portaobjetos son digeridos con endonucleasas específicas de lesiones o enzimas de restricción que reconocen entre otras, bases del ADN alteradas o anómalas donde realizan cortes, originando sitios apurínicos o AP en dicha cadena de ADN. De existir tal reconocimiento por las endonucleasas, el mismo se traducirá por un aumento en el tamaño de la cola del cometa, sea en distancia recorrida o aumento de la cantidad de ADN contenida en la misma. Posteriormente, mediante los métodos de análisis y cálculos correspondientes se podrá determinar el tipo de lesión producida por el estresor ambiental el ADN celular. De esta manera, los diferentes tipos de lesiones en el ADN pueden ser detectados utilizando diferentes enzimas específicas de lesiones como las endonucleasas (Azqueta y Collins 2013, Azqueta y col. 2014). Por ejemplo, las endonucleasas más comúnmente usadas en este sentido son las enzimas bacterianas endonucleasa III (EndoIII, también conocida como Nth) y formamido-pirimidina ADN-glicosilasa (Fpg). Endo III reconoce pirimidinas oxidadas, incluyendo glicol de timina y glicol de uracilo, y Fpg reconoce y elimina varias purinas oxidadas en el ADN dañado tales como 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-Gua), 2,6 diamino-4 -hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua), y 4,6-diamino-5-formamidopiridina (FapyAde). La actividad de la Fpg liasa deja sitios apurínicos que pueden ser detectables por el ensayo de cometa (Azqueta y Collins 2013, Azqueta y col. 2014). Por lo tanto, la metodología de EC modificada se recomienda para su uso como un biomarcador sensible para medir el tipo de daño oxidativo al ADN en estudios de genotoxicidad (Collins y col. 1996, Kushwaha y col. 2011, Collins y Azqueta 2012).

1.5.5. Nuevos objetivos en ecotoxicología y citogenética

Considerando lo anteriormente expuesto, las nuevas preguntas de los ecotoxicólogos destacan lo siguiente:

- La solución no es medir más biomarcadores con la esperanza de observar patrones significativos. En ausencia de modelos biológicos que integren procesos a nivel sub-organismo con el estado y bienestar de los organismos, la mejor puesta a prueba de los biomarcadores es mediante la generación de hipótesis comprobables en estudios cuidadosamente controlados, en los cuales se establezcan los efectos de los estresores ambientales en los organismos (Venturino y col. 2003, Forbes y col. 2006, Newman 2014).
- Aplicar varios biomarcadores o una batería de biomarcadores que resulte en predicciones ecotoxicológicas que permitan dar explicaciones significativas entre niveles, lo cual mejorará la interpretación de los efectos de los estresores ambientales y ayudará a decisiones seguras sobre su posible impacto (Venturino y col. 2003, Sparling y col. 2010, Ossana y col. 2013). Además, como las exposiciones ambientales son bastante complejas, la

implementación de una batería de biomarcadores es altamente recomendable para realizar evaluaciones de riesgo ambiental en poblaciones de anfibios (Venturino y Pechen de D'Angelo 2005, Newman 2014).

- Existe actualmente una necesidad de integrar los biomarcadores a distintos niveles, dado que los cambios en los biomarcadores como respuestas múltiples integradas ocurriendo en los organismos evaluados, se convierten en una señal confiable para evaluar el grado de deterioro del medioambiente. La complejidad de estresores ambientales interactuando en los ambientes naturales, hace necesario la utilización no sólo de un biomarcador sino varios integrados para un diagnóstico completo de la degradación ambiental (Ossana y col. 2013).
- Finalmente, es necesario efectivizar la utilización de los biomarcadores citogenéticos mediante nuevos estudios que consideren: la optimización de los procedimientos básicos y la generación de datos históricos en los grupos control, bioensayos específicos para evaluar respuestas en órganos y tejidos, conocer las fuentes biológicas y naturales de variación; determinar la citotoxicidad y viabilidad celular, aplicar las técnicas a un amplio espectro de organismos relevantes ecológicamente, realizar estudios sobre reparación del ADN y sobre secuencias génicas específicas y aplicar las técnicas a las líneas celulares germinales. Posteriormente, para dar explicaciones válidas sobre los efectos de los estresores ambientales a distintos niveles, es necesario que esta información pueda conectarse/relacionarse con otros biomarcadores o respuestas ecotoxicológicas como la capacidad de eliminar oxiradicales, las actividades enzimáticas y de estrés oxidativo, la expresión génica, mutaciones puntuales, procesos de apoptosis, histopatología y neoplasia, inmunotoxicidad y neurotoxicidad, y con el crecimiento, desarrollo y éxito reproductivo, entre otros (Jha 2008).

En definitiva, como Newman (2014) señala en un extremo del espectro de enfoques está el reduccionismo (microexplicación), que intenta comprender el comportamiento de las unidades más simples en los niveles más bajos de organización, y luego utiliza este entendimiento para explicar fenómenos en todos los niveles superiores. Por analogía, un reloj se entiende completamente si se entiende el funcionamiento de todas sus partes, o el destino de una especie es predecible si se conoce el impacto del estresor de interés sobre su supervivencia, reproducción, crecimiento y desarrollo.

En contraste, el holismo sostiene que, debido a que las propiedades únicas emergen en niveles más altos de organización y las complejas interacciones entre las partes engendran dinámicas complejas, el entendimiento descriptivo de los procesos de orden superior es mucho más útil para la predicción, que construir una estructura mecanicista desde el nivel más bajo o fundamental al nivel más alto. En realidad, ambos enfoques son exitosos sólo cuando se apoyan mutuamente en su utilización. Análisis y enfoques solitarios está demostrado que no funcionan más allá de un alcance limitado. La predicción de un estudio holístico se limita al objeto inmediato de estudio o muy similar si un investigador no entiende los componentes del sistema, sino que sólo describe fenómenos al más alto nivel de organización. La predicción

limitada hace que el movimiento hacia el objetivo científico de la Ecotoxicología sea extremadamente ineficaz. En ese sentido resulta fundamental utilizar biomarcadores en cada nivel que provean información útil y precisa sobre el estresor estudiado, y de esta manera poder aplicarlos como herramientas útiles, tanto en especies bioindicadoras como para evaluaciones de riesgo ambiental y toma de decisiones.

1.6. Especies seleccionadas como modelo de estudio

1.6.1 Especies de estudio

Las especies propuestas para el presente trabajo son *Boana pulchella* y *Leptodactylus latinasus*, las cuales habitan la región pampeana de Argentina y son especies abundantes de amplia distribución en los Neotrópicos, lo que significa que se pueden encontrar y utilizar en la mayor parte de la región pampeana y en otros países sudamericanos. En cuanto a su estado de conservación, ambas especies propuestas son consideradas de "menor preocupación" o "no amenazadas" según las clasificaciones de la *International Union for Conservation of Nature* o IUCN (2017) y de la Asociación Herpetológica Argentina (Vaira y col. 2012). Vale aclarar que un aspecto importante considerado en la selección de estas especies tiene que ver con su hábitat y reproducción en los ecosistemas (tierra, agua, vegetación), de esta manera varias estrategias de vida son abordadas considerando además la partición de un estresor ambiental en los distintos compartimientos del ambiente.

Si evaluamos en el plano ecotoxicológico, los estudios realizados a nivel local sobre especies de anuros de la región pampeana y que habitan agroecosistemas se han basado en *R. arenarum*, una especie que se presenta con baja frecuencia en agroecosistemas y de conocida tolerancia a diferentes plaguicidas (Ruiz de Arcaute y col. 2012, Agostini y col. 2016, Suárez y col. 2016). En este sentido, actualmente, herpetólogos y ecotoxicólogos locales plantean la necesidad de generar información sobre la biología y específicamente conocer las respuestas ecotoxicológicas de otras especies representativas de la región pampeana, para ser utilizadas como bioindicadoras de esos ambientes. Según los últimos estudios realizados en agroecosistemas de la región pampeana, se ha destacado que las especies que ocurren con más frecuencia son *Leptodactylus latinasus*, encontrada en la totalidad de los ambientes monitoreados, y seguida luego por *Boana pulchella* (Agostini y col. 2016, Suárez y col. 2016).

1.6.1.1 *Boana pulchella* como especie de estudio

Boana pulchella (Duméril y Bibron 1841) (previamente conocida como *Hypsiboas pulchellus*) posee varios nombres comunes como: Ranita de Zarzal, Rana Trepadora Común o Montevideo Treefrog. Su tamaño va desde 32–46 mm en machos y de 41–48 mm en hembras. *B. pulchella* es una especie arbórea de la familia Hylidae con extensa distribución en

la América Neotropical y es una especie abundante en la región pampeana de Argentina (Ceí 1980). Sus hábitats naturales son ambientes subtropicales o tropicales, secos o húmedos, en praderas de tierras bajas inundadas, lagunas permanentes o temporales de agua dulce, humedales permanentes o temporales de agua dulce y pastizales (Kwet y col. 2004). Un aspecto particular es que su actividad reproductiva es más intensa en tres momentos distintos del año: agosto-septiembre, noviembre-diciembre y marzo-abril en la región pampeana de Argentina lo que hace posible que tenga diferentes tipos de larvas según la época del año, sea de invierno o verano, alcanzando grandes tamaños y con lento desarrollo (Gallardo 1987). Esta especie pone sus huevos en masas unidas a los tallos sumergidos de plantas acuáticas, y es fácil de manejar y aclimatarse a condiciones de laboratorio (Natale y col. 2000, 2006). La especie presenta dos vocalizaciones diferentes: la primera es breve y se puede oír antes o después de una lluvia o al amanecer y al atardecer, mientras que la segunda vocalización es más intensa y está asociada con la reproducción (Gallardo 1987). Los machos vocalizan en cercanía al agua, posados sobre cañaverales, juncales o macrófitas acuáticas de gran porte como *Sagitaria* sp. Su alimentación principalmente está basada en la consumición de escarabajos, lepidópteros, arañas, moscas y mosquitos. Durante los meses más fríos, la mayoría de las especies entran en hibernación y disminuyen drásticamente la actividad de sus poblaciones, pero *B. pulchella* continúa alimentándose incluso a bajas temperaturas para proporcionar la energía adicional necesaria para permitir el cortejo en los machos (Da Rosa y col. 2011, Antoniazzi y col. 2013) (Figura 9).

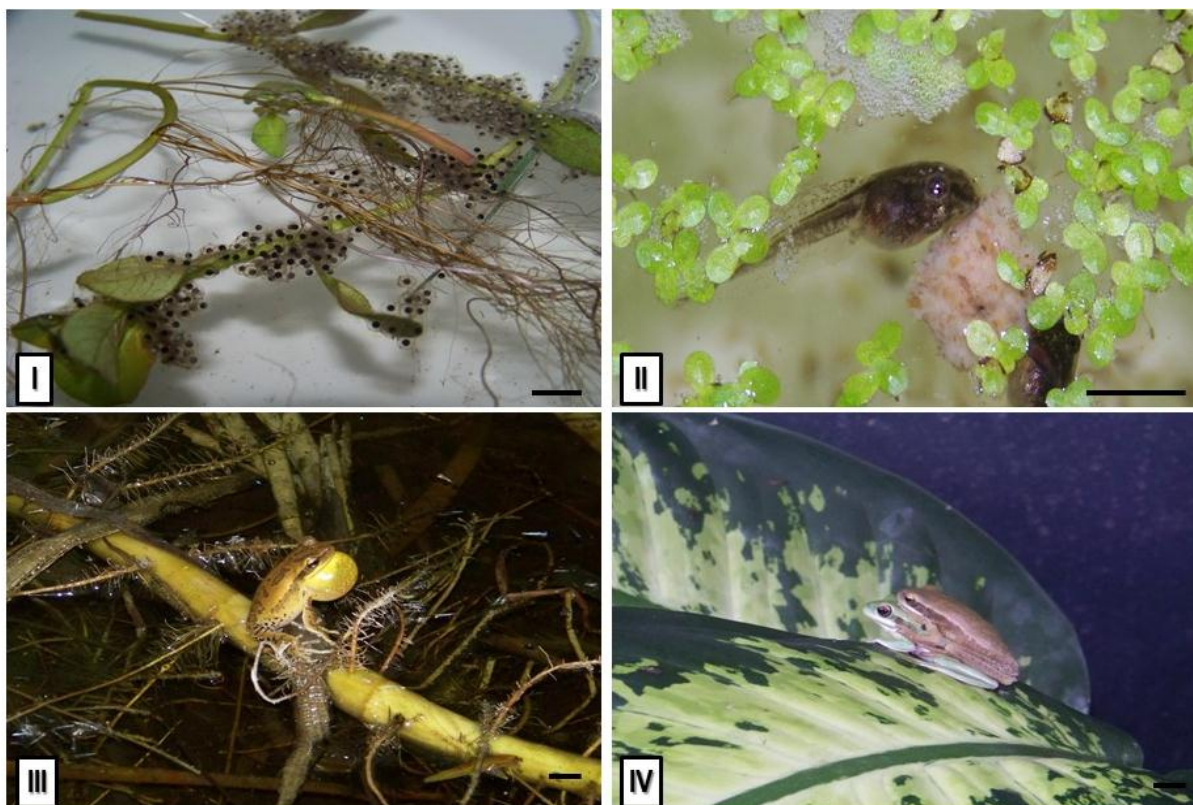


Figura 9. *Boana pulchella* en sus distintas etapas del ciclo de vida que van desde huevo (I), larvas en cautiverio (II), adultos macho vocalizando (III) y amplexo en etapa de reproducción (IV). La barra representa 1cm. Fotografías originales de autor.

En el caso de *B. pulchella*, además de ser una especie representativa de ambientes pampeanos y que habita en zonas de intensa actividad agrícola, posee ciertas particularidades que han favorecido su elección como modelo de estudio para el actual trabajo de tesis. Estas características, como se mencionó anteriormente, son que poseen larvas presentes durante todo el año debido a que los tres periodos reproductivos coinciden con el llenado de las charcas temporales luego de fuertes lluvias y esta presencia anual las hace más vulnerables no sólo a los bruscos cambios estacionales, sino también a la exposición constante de plaguicidas en las diferentes épocas del año. Sumado a esto, se considera el modo de vida como una vía particular de exposición ya que reposan en las hojas o axilas de plantas, por lo que el rociado directo (o *drift*) es el contacto más probable del herbicida con la piel. Además se pueden considerar otras vías secundarias de exposición como los insectos rociados con plaguicidas que son su alimento o la escorrentía superficial que llega a las charcas donde se reproducen.

En lo que concierne a los estudios ecotoxicológicos en *B. pulchella*, algunos de ellos han demostrado que la especie puede ser afectada por distintos estresores ambientales en diversas etapas de su desarrollo, principalmente

mediante la evaluación de parámetros poblacionales y puntos finales que van desde la mortalidad hasta biomarcadores individuales, bioquímicos y citogenéticos en los ambientes naturales alterados por la actividad agrícola y donde se aplican diferentes tipos de pesticidas (Agostini y col. 2009, 2013, 2016, Brodeur y col. 2009, 2011, 2012, Sanchez y col. 2013, López y col. 2015, Moreira y col. 2015, Suárez y col. 2016). Además, se han realizado varios estudios de laboratorio evaluando los efectos adversos de metales pesados (Natale y col. 2000, 2006) e insecticidas en larvas (Agostini y col. 2009, 2010, Junges y col. 2010, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014); sin embargo, este tipo de estudios han sido escasos al evaluar los efectos de herbicidas sobre esta especie (Peltzer y col. 2013a). Asimismo, resulta importante destacar que hasta el momento no se han registrado estudios ecotoxicológicos sobre las respuestas de los diferentes biomarcadores en laboratorio luego de la exposición experimental en adultos de *B. pulchella*.

1.6.1.2 *Leptodactylus latinasus* como especie de estudio

Leptodactylus latinasus (Jiménez de la Espada 1875), conocida comúnmente como “rana piadora” o “rana urnera”, es un anuro de tamaño mediano (28-40 mm) disperso en diversos ambientes como praderas costeras, pampeanas, y agroecosistemas de toda la Argentina entre los 0 y 600 msnm (Cei 1980). Su hábitat es típico de especies terrestres encontradas en pastizales. Habitan en cuevas que ellas construyen pero también suelen encontrarse bajo troncos de árboles, piedras y en madrigueras o grietas. Prefiere manchas de barro, tierra con grietas y hierba corta con barro. Su reproducción ocurre a lo largo de la primavera y el verano durante los meses de octubre a febrero semanas antes de intensas lluvias (Gallardo 1987). Los machos suelen vocalizar desde las cuevas ubicadas a 10 centímetros de profundidad que se encuentran cerca del agua o en grietas y depresiones que eventualmente serán inundadas. *L. latinasus* vive en esas cuevas y es donde ponen los huevos en un nido de espuma, donde las larvas comienzan su desarrollo y emergen cuando es inundado por las lluvias o los arroyos que desbordan. Durante el amplexo, los machos usan las patas traseras para formar una espuma de albúmina producida por la hembra y así hacen un nido donde se depositan los huevos de color amarillo pálido y posteriormente ocurre el desarrollo larval. Se caracteriza por alimentarse de arañas y larvas de insectos, así como de isópteros, coleópteros y otros pequeños insectos como hormigas (Cuevas y Martori 2007). Es una especie generalista con una estrategia de forrajeo que se puede considerar intermedio entre sentarse y esperar y un predador de alimentación activa consumiendo así una gran diversidad de presas (Duré y Kehr 2004). Por poseer dedos sin reborde cutáneo, carencia de espinas en el primer dedo de la mano o en el pecho en machos y por realizar su ovoposición en una cámara de incubación subterránea construida para albergar el nido de espuma, pertenece a las especies del grupo *fuscus* dentro del género *Leptodactylus*. Las poblaciones de esta especie son estables, clasificadas como no amenazadas (Vaira y col. 2012, IUCN 2017) y son de fácil mantenimiento en condiciones controladas de laboratorio (Figura 10).

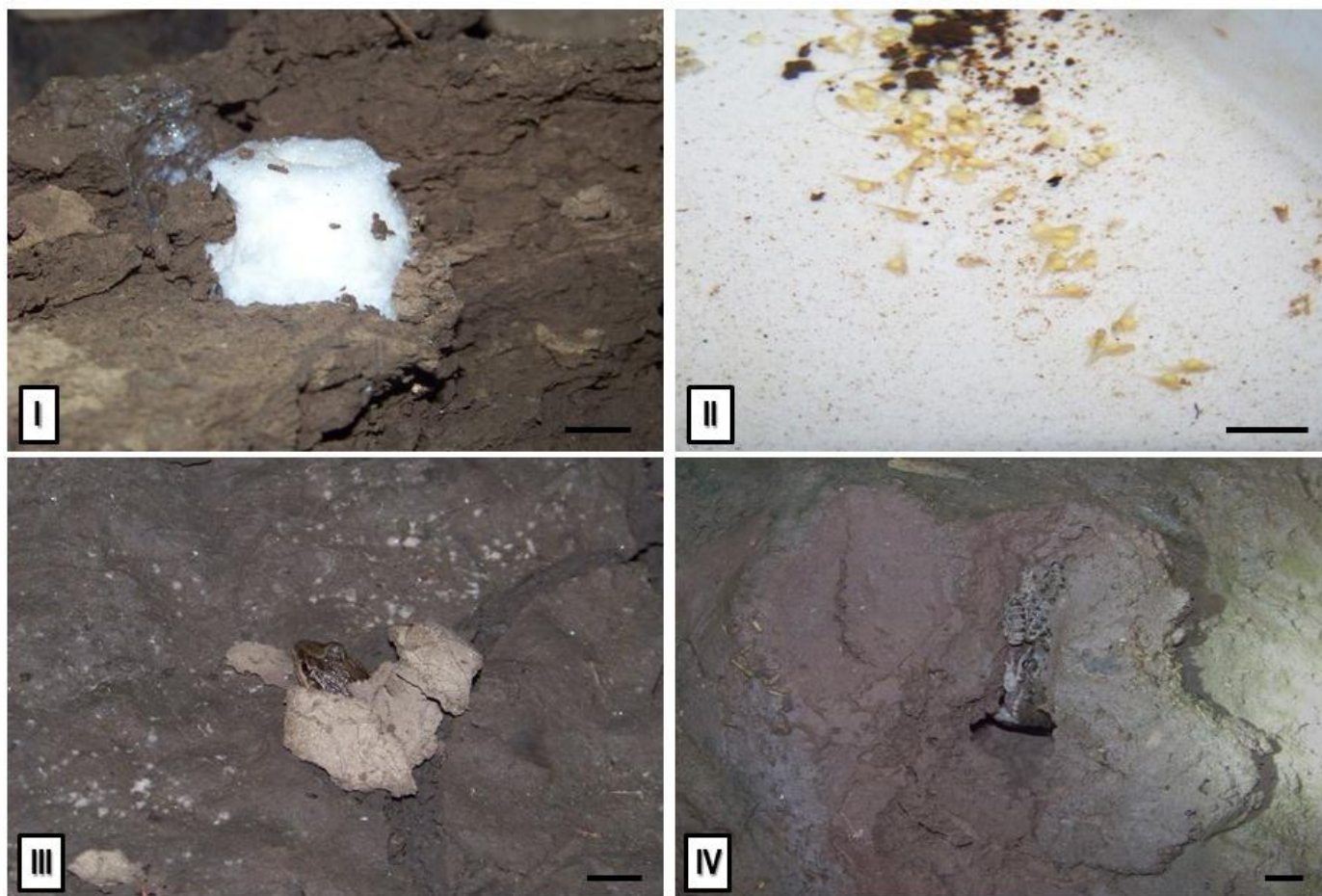


Figura 10. *Leptodactylus latinasus* en sus distintas etapas del ciclo de vida que van desde huevo en nidos de espuma (I), embriones (II), macho en la cueva (III) y macho y hembra en la cueva previo a la actividad reproductiva (IV). La barra representa 1cm. Fotografías originales de autor.

En el caso de *L. latinasus*, es considerada como bioindicadora de ambientes pampeanos con actividad agrícola con particularidades distintas a *B. pulchella*, por las que ha sido elegida como modelo de estudio para el actual trabajo de tesis. Dichas características son:

1) las larvas poseen un rápido desarrollo y no pueden migrar grandes distancias, quedando restringidas a la cueva donde son depositados los huevos, por lo que posiblemente frente a un estresor ambiental no tiene manera de escapar a la situación y

2) las principales vías de exposición a los estresores en los hábitats agrícolas son a través del contacto de la piel con el suelo o el agua, la aplicación directa o la ingestión de insectos.

Específicamente, según el modo de vida, la principal ruta o vía exposición en todos sus estadios del ciclo de vida, sería por eventos de escorrentía superficial (*run-off*) luego de intensas lluvias o por arroyos desbordados que descargan los plaguicidas hacia cuevas donde la especie deposita sus huevos en forma de nido de espuma, donde también allí los larvas se desarrollan y donde los adultos se reproducen.

En cuanto a los estudios ecotoxicológicos, hasta el momento sólo en los últimos 5 años se han utilizado para evaluar distintos parámetros poblaciones, individuales, bioquímicos y citogenéticos en sus ambientes naturales (Maragno y col. 2013, Sanchez y col. 2013, Attademo y col. 2014a, Guerra y Aráoz 2016, Medina y col. 2016, Suárez y col. 2016). Sin embargo, la especie no han sido utilizada como especie modelo para estudios ecotoxicológicos de laboratorio a pesar de ser mencionada como especie bioindicadora típica y más frecuente de ambientes perturbados por pesticidas como los agroecosistemas (Maragno y col. 2013, Agostini y col. 2016, Suárez y col. 2016).

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTUDIO

2.1 Hipótesis y objetivos de estudio

Por lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta los volúmenes en que los plaguicidas son utilizados en los agroecosistemas y los escasos estudios realizados con herbicidas en estas especies representantes de ambientes pampeanos, decidimos iniciar estas investigaciones tendientes a evaluar el perfil toxicológico y los posibles efectos que el herbicida IMZT puede ejercer en larvas y adultos de anfibios anuros representantes de agroecosistemas pampeanos, empleando biomarcadores de exposición y efecto en sistemas *in vivo*. En particular, el uso de diferentes estadios de vida de los anuros, larvas y adultos, para estas investigaciones se basa en la explicación previa (sección 1.5.3) de que los puntos finales a evaluar pueden mostrar diferentes respuestas fisiológicas según la fase de vida en la que se encuentren debido a que los roles tejidos, órganos y sistemas son completamente diferentes luego de la metamorfosis, como se observa en el caso de las funciones hepáticas (Figura 7).

A esto se suma, como se mencionara anteriormente, que los ecotoxicólogos y herpetólogos locales continúan planteando la necesidad evidente de poner a punto nuevas herramientas relacionadas a diferentes niveles ecológicos, que permitan detectar respuestas de alerta temprana utilizando especies autóctonas para evaluar problemas ambientales locales. En este sentido, uno de los objetivos del siguiente trabajo de Tesis Doctoral será evaluar las posibles correlaciones entre los biomarcadores y además se estudiará la respuesta de los MMC hepáticos (sistema pigmentario) por exposición a herbicidas para su posterior incorporación como un nuevo biomarcador histológico aún no estudiado en especies de anuros y de esta manera que pueda ser considerado como posible indicador de efectos subletales en relación al papel citoprotector de radicales libres y a los procesos de detoxificación de estresores ambientales que poseen estas células fagocíticas con pigmentos.

Por último, estas investigaciones aportarán datos del efecto adverso del herbicida, por lo que todo esfuerzo que se haga para demostrar el riesgo que puedan ocasionar estos compuestos, contribuye relevantemente al conocimiento del tema. Más aún, los resultados que se obtengan en la presente Tesis Doctoral buscan ser investigaciones de base para futuros estudios *in vivo* a fin de caracterizar los efectos tóxicos de los nuevos herbicidas que se están empleando en cultivos de importancia agroeconómica en nuestro país utilizando diferentes biomarcadores en anuros. Asimismo, permitirán incrementar la información sobre el efecto de los plaguicidas en Argentina en especies locales, para contribuir con mejores elementos y herramientas que permitan generar medidas para protección del ambiente y la salud humana en nuestro territorio.

2.1.1 Hipótesis general

El herbicida IMZT introducido directa o indirectamente en los ambientes acuáticos en concentraciones ambientales relevantes induce efectos letales y subletales (a nivel individual, histológico, bioquímico y citogenético) tanto en larvas como en ejemplares adultos de *B. pulchella* y *L. latinasus* presentes en agroecosistemas.

2.1.2 Hipótesis específicas

- I. La medición de los puntos finales propuestos en individuos expuestos permite detectar respuestas tempranas subletales a nivel bioquímico y citogenético.
- II. Los puntos finales bioquímicos y citogenéticos propuestos permiten detectar efectos adversos en anuros antes que estos sean irreversibles a concentraciones ambientalmente relevantes de exposición aguda o crónica.
- III. Los biomarcadores citogenéticos utilizando bioensayos específicos con anuros locales permiten detectar e interpretar el modo de acción de los plaguicidas.
- IV. Los biomarcadores citogenéticos son útiles para evaluar la capacidad de recuperación en larvas de anuros después que sufrieron una exposición aguda y por lo tanto podrían ser utilizados como herramientas en procesos de remediación.
- V. La utilización de respuestas histológicas-fisiológicas en órganos detoxificadores, como el hígado, puede ser utilizada como biomarcadores de efecto y exposición permitiendo detectar efectos adversos por la acción del herbicida.
- VI. Los puntos finales bioquímicos y citogenéticos propuestos se correlacionarán entre sí y con los puntos finales a nivel individual e histológico, lo que permite que pueden ser considerados herramientas válidas para realizar predicciones sobre efectos subletales y letales a nivel individual partiendo de mediciones bioquímicas subletales (según concepto de señales de alerta temprana).

En este contexto, el presente trabajo de Tesis Doctoral evaluará los efectos adversos ejercidos por el herbicida imazetapir a diferentes niveles de organización biológica utilizando biomarcadores citogenéticos, bioquímicos, histológicos, e individuales en larvas y adultos de anfibios anuros representantes de agroecosistemas pampeanos.

2.1.3. Objetivo general

Evaluar efectos a nivel bioquímico y citogenético inducidos por un imazetapir en larvas y adultos de anuros autóctonos presentes en agroecosistemas pampeanos asociados a efectos histológicos e individuales, para su posterior incorporación como herramienta bioanalítica de respuesta temprana en programas de monitoreo y diagnóstico ambiental.

2.1.4. Objetivos específicos

Estimar la toxicidad inducida por el herbicida imazetapir en su formulado Pivot® H (10,59 %), asociado al cultivo de maíz y soja transgénicos, mediante bioensayos de toxicidad en laboratorio utilizando diferentes puntos finales de evaluación a distintos los niveles de organización biológica, tanto en larvas y adultos de *Boana pulchella* y *Leptodactylus latinasus* (especies autóctonas bioindicadoras que habitan y se reproducen en agroecosistemas pampeanos).

2.1.5 Objetivos particulares

- I. Estudiar la toxicidad de IMZT mediante bioensayos en laboratorio sobre larvas de ambas especies de anuros, evaluando como puntos finales: efectos letales (mortalidad) y efectos subletales (comportamiento, crecimiento, desarrollo y presencia de anormalidades).
- II. Estimar genotoxicidad y citotoxicidad inducida por IMZT en larvas y adultos mediante biomarcadores de genotoxicidad empleando el ensayo cometa y frecuencia de micronúcleos.
- III. Estimar puntos finales subletales con biomarcadores bioquímicos de efecto tanto del sistema antioxidante, mediante la cuantificación la actividad de la enzima catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), como del sistema colinérgico, mediante la determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, en larvas y hepatocitos de adultos expuestos a IMZT.
- IV. Evaluar y relacionar en larvas y ejemplares adultos de las especies propuestas novedosos parámetros histológicos, bioquímicos y citogenéticos como posibles puntos finales indicadores de efectos tóxicos inducidos por IMZT, tales como la respuesta inmunológica considerando el sistema pigmentario en melanomacrofagos, cuantificando por histología la cantidad de melanina y por histoquímica la cantidad de hemosiderina y lipofusina.
- V. Comparar la sensibilidad entre especies en la respuesta al herbicida IMZT, considerando todos los puntos finales.
- VI. Analizar la correlación entre los diferentes puntos finales y con las concentraciones de exposición evaluadas en el laboratorio.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

“METODOLOGÍA DE ESTUDIO EMPLEADA EN LA EVALUACIÓN DE PUNTOS FINALES”

3.1. Sitios de captura de las especies

3.1.1. Selección de los sitios de captura de las especies

El área en el que se llevaron a cabo los estudios de anfibios del presente Trabajo de Tesis Doctoral se encuentra en las afueras de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires y está comprendida dentro del valle de inundación del arroyo “El Pescado”, situada en la provincia biogeográfica definida como “Provincia Pampeana” (Cabrera y Willink 1973). Según estos autores, la Región Pampeana se distingue por la abundancia y la diversidad de humedales. La zona de estudio pertenece a la “cuenca parano-platense” y particularmente la cuenca “El Pescado” es ejemplo de cuenca con arroyos pertenecientes al partido de Magdalena que presentan un hábitat único y posee escaso nivel de alteración, a pesar de estar cercana a las zonas más industrializadas y densamente pobladas de la región (Canevari y col. 1999). Dentro de esta cuenca, fueron seleccionados 7 sitios de estudio con escasa o nula perturbación antrópica para cada especie (Figura 11). Para la selección de sitios se consideraron estudios históricos en la región que mencionan a dichos sitios como lugares reproductivos y de intensa actividad para cada especie (Natale 2006). Específicamente, los sitios seleccionados fueron:

➤ El sitio “Santa Ana” establecimiento situado dentro del valle de inundación del arroyo El Pescado, localizado en Ignacio Correas (35°01'16.03"S, 57°51'25.45"O). Particularmente, en este sitio la actividad antrópica es escasa con leve pastoreo y se forman en el lugar charcas temporarias debido a que recibe los aportes hídricos de las crecidas del arroyo y del agua proveniente de las lluvias. En dicho sitio se realizaron actividades de monitoreo y fueron registradas ambas especies (Figura 11A).

➤ El sitio “El Edén”, establecimiento situado dentro del valle de inundación del arroyo El Pescado, localizado en Ignacio Correas (35°01'00.39"S, 57°51'53.40"O). En el establecimiento se desarrolla la actividad de cría de ganado por pastoreo y cuenta con un sitio inundable donde se acumulan los aportes de las crecidas del arroyo y del agua proveniente de las lluvias, dando lugar a la formación de charcas temporarias. En dicho sitio fueron registradas ambas especies (Figura 11B).

➤ El sitio denominado “Charca Ángel”, se encuentra localizado en el Barrio de Parque Sicardi (34°59'44.94"S, 57°51'42.74"O). Es un sitio con escasa o nula actividad de pastoreo y agricultura, al momento de comenzar los monitoreos. No obstante, se encuentra alterado por el marcado crecimiento poblacional y urbanístico en la zona. El sitio cuenta con áreas deprimidas donde se acumula agua de lluvia y se forman charcas temporarias. En dicho sitio fueron registradas ambas especies (Figura 11C).

➤ El sitio “Charca Frisón”, es una laguna temporal situada en el Barrio de Parque Sicardi (34°59'05.02"S, 57°51'22.08"O). La misma cuenta con un área deprimida donde se acumula agua producto de las intensas lluvias durante

la etapa de primavera y otoño. Al comienzo de los monitoreos la zona registraba una baja actividad antrópica, aunque actualmente es un sitio que está amenazado de presentar alteraciones por un elevado desarrollo antrópico en la misma. En dicho sitio sólo se realizaron monitoreos sobre *B. pulchella* (Figura 11D).

➤ El sitio denominado “Charca Bufo”, es una laguna permanente distante de los principales arroyos de la cuenca. Se encuentra localizada en la periferia del Barrio Parque Sicardi (34°59'53.47"S, 57°52'27.74"O). En el establecimiento no se desarrolla actividad antrópica aunque se estima el crecimiento urbano por desarrollo de barrios y viviendas por lo que está sufriendo modificaciones sobre la vegetación riparia. En dicho sitio fueron registradas ambas especies (Figura 11E).

➤ El sitio “Gauchito Gil”, es un terreno deprimido situado en la periferia del Barrio de Parque Sicardi, dentro del valle de inundación del arroyo El Pescado (35°00'00.96"S, 57°52'17.91"O). En este sitio no se realizan actividades de tipo agropecuario u otro tipo de actividad antrópica. Cuenta con varias áreas deprimidas que luego de las intensas lluvias, durante la época de verano y otoño, forman pequeñas charcas temporarias de poca profundidad. Actualmente, la zona puede verse amenazada por el desarrollo urbanístico planificado sobre el sitio. Específicamente, sólo se realizaron monitoreos sobre *L. latinasus* (Figura 11F).

➤ El sitio denominado “Vaca Loca”, establecimiento situado en las cercanías al Arroyo El Pescado ubicado dentro del valle de inundación del mismo (34°58'45.56"S, 57°49'45.09"O). En este sitio, registra leve pastoreo. Cuenta con una gran área deprimida que acumula agua por crecidas del arroyo o luego de las lluvias, formando de esta manera charcas temporarias principalmente desde la primavera al otoño. En dicho sitio sólo se realizaron monitoreos sobre *L. latinasus* (Figura 11G).

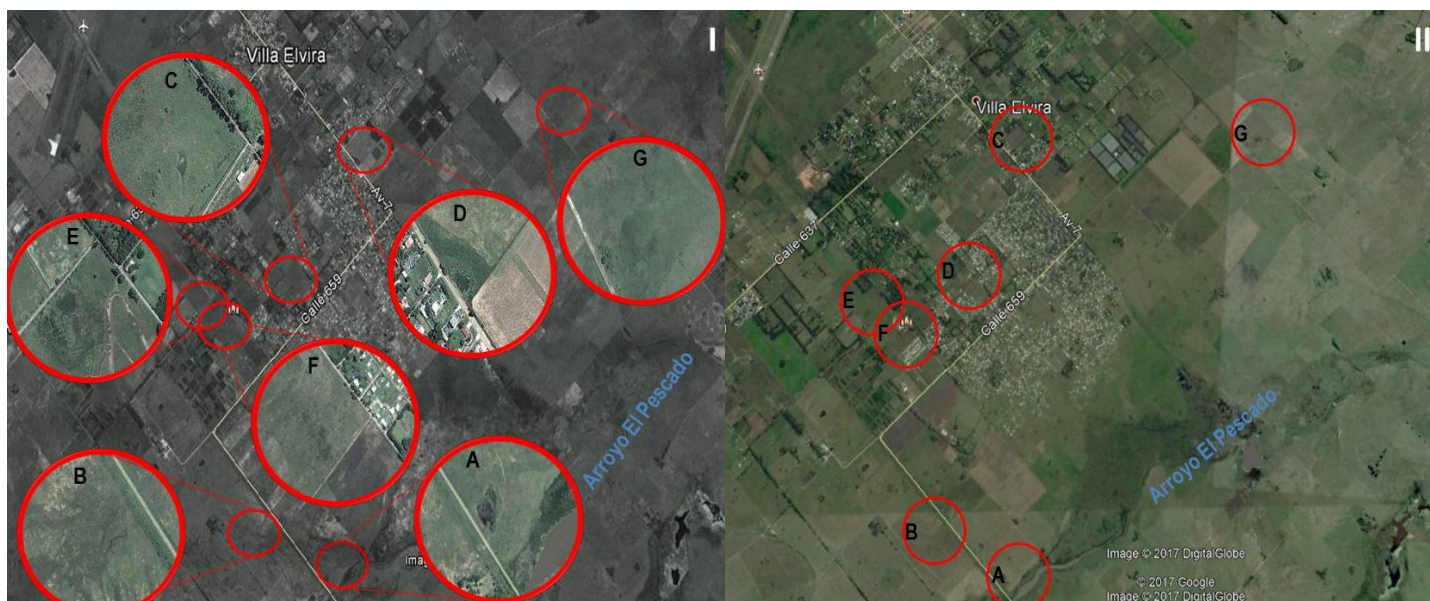


Figura 11. Sitios de monitoreo de las especies de estudio en sitios de escasa o nula actividad agrícola en ciudad de La Plata desde comienzos de 2013 (I) y con gran urbanización para comienzos de 2017 (II). Los círculos rojos muestran en detalle cada sitio muestreado en la zona, Establecimiento Santa Ana (A), El Edén (B), Charca Ángel (C), Charca Frisón (D), Charca Bufo (E), Gauchito Gil (F), y Vaca Loca (G). Modificadas de Google Earth 2017.

3.1.2. Descripción floro-faunística de los sitios de captura

Los sitios monitoreados en la sección anterior (3.1.1) se caracterizan por una vegetación típica de la región pampeana con fragmentos de árboles de ceibo (*Erythrina crista-galli*), talas (*Celtis tala*) y pajonales de *Eryngium* spp., en regiones aledañas a los cuerpos de agua. Específicamente, en los cuerpos de agua, sean lagunas permanentes o temporales (depresiones entre 7 y 19 msnm), abundan arbustales y herbáceas como asociaciones de juncuales, pajonales y totorales. Entre las especies predominantes se encuentran *Cortaderia* sp., *Juncus pallescens*, *Scirpus giganteus*, *Schoenoplectus* sp., y *Thypha latifolia* relacionadas con hábitats palustres y terrestres. Asimismo, es frecuente encontrar plantas típicas de hábitat acuático como *Alternanthera philoxeroides*, *Eichornia* sp., *Hydrocotyle* sp., *Lemna gibba*, *Myriophyllum aquaticum*, *Polygonum* sp., *Sagittaria sagittifolia*, y floraciones durante el invierno de *Azolla filiculoides* (Passarelli y col. 2014)(Figura 12A, B).

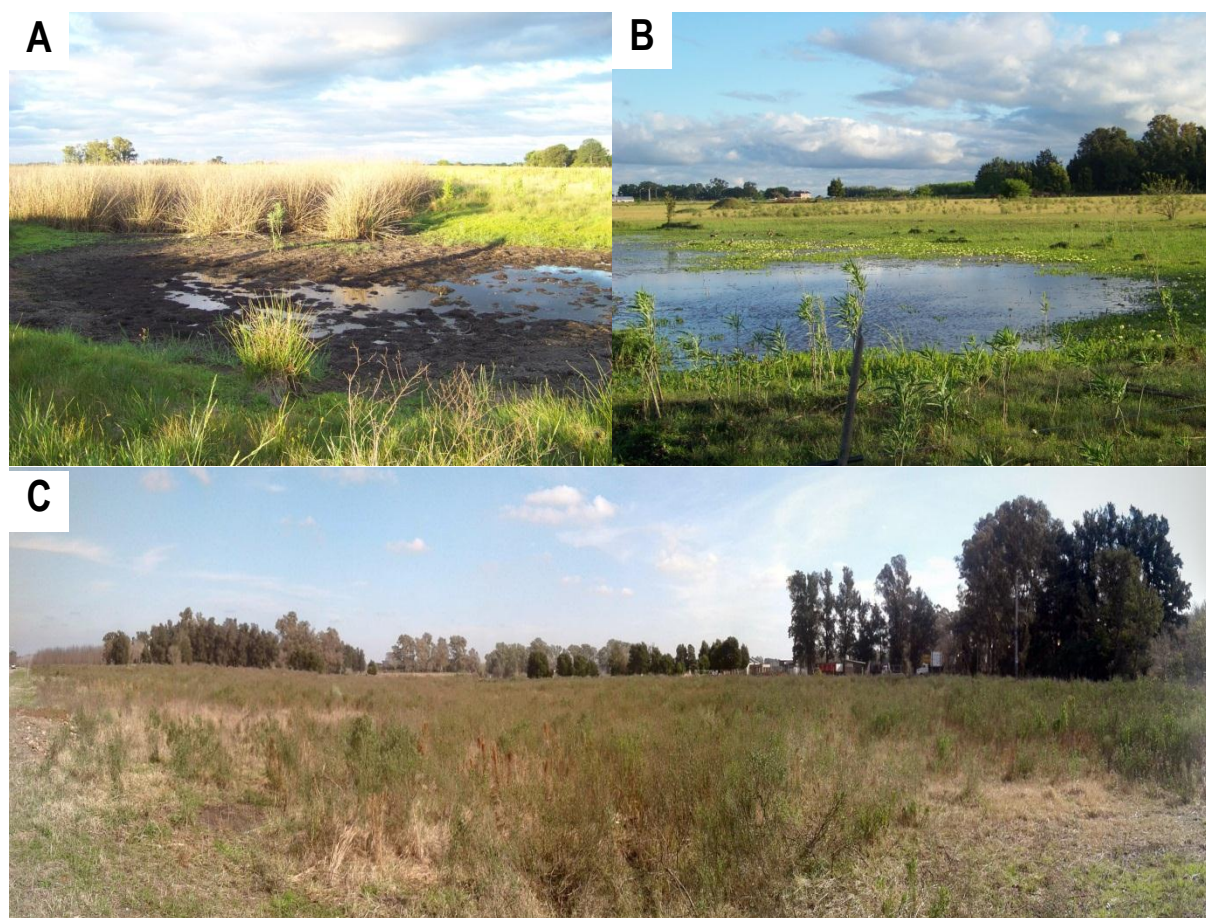


Figura 12. Sitios de captura para ambas especies. A: Charca temporal del establecimiento SA donde se muestrearon ambas especies; B: Charca Bufo, laguna permanente donde se monitoreaba a *Boana pulchella*; y C: Sitio GG, ambiente típico de pastizal-arbustal donde se reproduce *Leptodactylus latinasus*.

Por otro lado, en zonas aledañas a los humedales (aproximadamente a 60 m de distancia y en zonas entre 9 y 21 msnm, 2 msnm más que en zonas de humedales como lagunas permanentes o temporales) se encuentran las asociaciones típicas del pastizal (gramíneas de los géneros *Agropyron* sp., *Botriochloa* sp., *Cortaderia* sp., *Paspalum* sp., *Poa* sp., *Stipa* sp., y *Zizaniopsis* sp.) con sucesión de césped ribereño, matorral herbáceo y bosque hidrófilo (Passarelli y col. 2014). Junto a esta vegetación dominante se encuentran herbáceas típicas de hábitat terrestre como *Baccharis* sp., *Coniza bonariensis*, *Plantago* sp., *Polygonum* sp., *Senecio bonariensis*, y *Verbena intermedia*. Estos ambientes no poseen cobertura vegetal típica de árboles y arbustales aunque se podían encontrar fragmentos de tala y cardos (Passarelli y col. 2014). Generalmente, se caracterizan en épocas de sequía por tener suelo desnudo con grietas de desecación que por la humedad contenida alberga pequeños vertebrados e invertebrados (Figura 12C).

La anurofauna pampeana de los ambientes de lagunas temporales y permanentes con la vegetación típica, previamente descrita, se caracteriza por la presencia de *B. pulchella* así como también otras especies como *R. fernandezae* y *R. arenarum* con reproducción explosiva en sitios temporales de poca profundidad, *L. latrans* asociada a los márgenes de las charcas o cuerpos de agua y otros hylidos como *Scinax squalirostris* y *S. granulatus*, *Dendropsophus minutus* y *Pseudis minutus* (Gallardo 1987). Por otro lado, en los ambientes aledaños a los humedales las características propias de esos ambientes hacen posible la ocurrencia de *L. latinasus*, asociada a otros anuros de hábitos cavícolas o fosoriales como *P. falcipes* y *L. gracilis* (especie emparentada taxonómicamente) e inclusive la rana criolla *L. latrans*, frecuente en este tipo de pastizales para alimentarse. En eventos de intensas precipitaciones y registros de elevadas temperaturas durante primavera-verano, *L. latinasus* suele estar acompañada en estos ambientes por el escuercito *Odontophrynus americanus* y el escuerzo *Ceratophrys ornata* (Gallardo 1987).

3.2. Métodos de captura y estudio de las especies

En los sitios previamente descriptos se realizaron las actividades de monitoreo y colecta de huevos, larvas y ejemplares adultos de *B. pulchella* y *L. latinasus*. En algunos casos, las especies cohabitaban en los sitios pero ocupando diferentes ambientes (ver sección 3.1.2), brevemente se conoce *B. pulchella* habita ambientes inundados permanentes o temporales de juncuales y cañaverales mientras que *L. latinasus* está presente en ambientes con suelo desnudo o escasa vegetación predominada por pastos o hierbas en zonas inundables temporales.

En particular, los muestreos y colectas se realizaron de manera diferente según sean huevos, larvas o adultos y considerando la particularidad de cada especie así como las metodologías propuestas por varios autores para el muestreo de anfibios (Heyer y col. 1994, Angulo y col. 2006). En relación al manejo en cautiverio se tuvieron en cuenta aquellos estándares básicos en relación con el ciclo natural de la especie y automatización de las mismas siguiendo los manuales de cría y mantenimiento en cautiverio (Mattison 1987, Nace 1977, Staniszewski 1995, ASIH 2004) que proponen:

1. Cambio regular del agua;
2. Temperatura/humedad apropiadas según la historia natural de la especie;
3. Exposición a luz natural (o un equivalente artificial de calidad) si la exposición es habitual en la historia natural de la especie;
4. Alimentación adecuada en función de la especie, con suplementos de vitaminas y minerales;
5. Provisión de las condiciones climáticas (humedad, fotoperiodo, etc.).

Sumado al monitoreo de las especies en cada sitio de estudio se registraron las variables abióticas tales como temperatura ambiental (a), humedad (b), precipitación acumulada por mes (c), nubosidad (d), temperatura del agua (e), oxígeno disuelto en agua (f), pH (g) y horario de muestreo (h), discriminando para el análisis aquellas de mayor relevancia.

Además, se consideraron en los seguimientos algunos componentes bióticos de los sitios muestreados tales como riqueza de especies de la comunidad de anuros y su actividad, presencia de potenciales predadores y parámetros poblacionales en las especies de estudio a diferentes niveles de organización que resultan de interés con el objetivo de establecer nueva información de base que permita utilizar a las dichas especies como bioindicadoras y especies modelo para estudios ecotoxicológicos. Específicamente, las variables o puntos finales de interés a evaluar en las poblaciones naturales fueron: abundancia relativa en relación a las variables abióticas, sexo, clase etaria, frecuencia de anormalidades, alteraciones en el comportamiento, presencia de parásitos en los organismos colectados, actividad reproductiva, e índices K, IHS y IGS. Las colectas se realizaron con los permisos adecuados de la Dirección de Flora y Fauna de la provincia de Buenos Aires (Argentina) (código 22500-22339/13 disposición 55 y 108) y el Comité de Ética de la Universidad Nacional de La Plata (código 11/N619). Por otra parte, los procedimientos de cría y mantenimiento de anfibios en cautiverio fueron aceptados debidamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Número de protocolo: 023-22-15).

3.2.1. Métodos de colecta y estudio de *Boana pulchella*

3.2.1.1 Muestreo de huevos, larvas y adultos

La metodología de muestreo empleada para la búsqueda de huevos y adultos de *B. pulchella* consistió en el reconocimiento de sus sitios reproductivos y la técnica de muestreo empleada se realizó mediante encuentros visuales y auditivos seguidos de la colecta manual. En el caso del relevamiento de huevos, fueron buscados durante el día y la noche en fechas posteriores a la época en que se detectaba la mayor actividad reproductiva de la especie y durante las caminatas se registró la presencia de las masas gelatinosas en los tallos sumergidos de las plantas vasculares acuáticas o palustres, como se observa en la Fig. 9. I. Una vez localizados los huevos, se realizó la colecta de una porción de las desovas (10-25%) con parte de la vegetación adherida. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas con agua del sitio y un volumen equivalente de aire para el traslado al laboratorio según recomendaciones de Angulo y col. (2006). La colecta de larvas y adultos se realizó de modo similar, con la excepción de que en adultos el volumen de agua colocado en las bolsas fue del 5% y el resto de la bolsa contenía aire. En este caso, el esfuerzo de captura fue equivalente a 4 h/hombre por sitio de muestreo, coincidiendo aproximadamente con lo reportado en la literatura (Heyer y col. 1994). Específicamente en larvas, luego de registrada actividad reproductiva en cada sitio, se utilizó la metodología *dipnetting* que consiste en

utilizar redes de mano, las cuáles se sumergen en el fondo de cuerpos de agua cubiertos de vegetación o hábitats de gran complejidad estructural como lagunas, charcas temporales o arroyos con acceso limitado. El pasaje de la red de mano se realizaba como mínimo tres veces en un mismo punto de muestreo y al menos en 5 sectores aleatorios equidistantes dentro de cada sitio de muestreo. Esta técnica se utilizó en horarios diurnos y nocturnos con un esfuerzo de muestreo 2 h/persona. En este sentido, el esfuerzo total de muestreo considerando todos los sitios fue de 30 horas. Por último, en el caso de los adultos colectados a campo, se registraron en épocas pre- y post- reproductivas, y los individuos colectados en cada caso fueron medidos, pesados, fotografiados, registrados, y liberados siguiendo las recomendaciones de Heyer y col. (1994).

En algunos sitios, se colectaron 5 individuos adultos de cada especie temporalmente para estudios de interés relacionados a los parámetros citológicos, bioquímicos, histológicos e individuales a fin de obtener valores e índices normales en esas poblaciones que pudieran ser utilizados como parámetros de referencia en comparaciones posteriores. Los individuos seleccionados y colectados para el traslado a laboratorio fueron colocados en bolsas plásticas con un 5% del sustrato húmedo según fuera mencionado anteriormente (Angulo y col. 2006). Una vez en el laboratorio, los individuos fueron diseccionados según protocolos que se detallarán más adelante en la sección 3.4. y posteriormente se evaluaron los parámetros bióticos o biológicos relacionados con el bienestar (o *fitness*) del animal según lo detallado anteriormente. Por otro lado, otras 5 ranas fueron trasladadas a los sistemas de cría en jaula (ver sección 3.2.1.2). En casos específicos, con el fin de realizar los bioensayos de toxicidad planteados, fueron realizadas colectas puntuales de adultos, los cuales fueron trasladados al laboratorio como se mencionado anteriormente.

3.2.1.2 Cría y mantenimiento de huevos, larvas y adultos en laboratorio

Las larvas para los ensayos se obtuvieron a partir de masas de huevos provenientes de los sitios mencionados previamente. Los huevos fueron colocados en bateas plásticas de 20 a 40l donde fueron mantenidos en las siguientes condiciones controladas de laboratorio: fotoperiodo de luz:oscuridad (16:8), con agua de bioensayo (agua de red previamente filtrada por filtro físico Aqua-Pure® de 5 µ Modelo AP-110 H/C y declorinada por 48 h); temperatura aire-agua, 25 ± 1 °C; pH = $7,6 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, $7,7 \pm 0.3$ mg/l; conductividad, 1025 ± 15 µS/cm; dureza, 181 ± 35 mg/l CaCO₃; burbujeo en bateas, constante 90 burbujas/min) hasta que alcanzaron el estadio de desarrollo 9 (GS9) según la clasificación propuesta por Gosner (Gosner 1960). Cuando los embriones alcanzaron el GS9, se les realizó tareas de limpieza y mantenimiento a las bateas retirando restos de vainas donde estaban inmersos los huevos así como también los huevos no fecundados y embriones muertos. Cuando las larvas llegaron al GS25, momento en el cual son individuos de vida libre con branquias internas y desarrollo de la morfología oral completa para su alimentación independiente (Gosner 1960), se les suministró como fuente de alimento 1 g de pellet o escamas de peces comerciales/g de larva cuatro veces

por semana (TetraMin®, Tetra Werke, Alemania o Shulet® Carassius, Shulet S.A, Argentina) hasta que los individuos alcanzaron el estadio de desarrollo adecuado para los correspondientes bioensayos (GS25 o GS36, según el bioensayo a realizar) y en ese momento se detuvo la alimentación. Por otro lado, se consideró para la cría de larvas que la densidad no superara el máximo de 10 larvas/l del acuario a fin de obtener un crecimiento óptimo y lograr el menor estrés posible (Kehr 1987, 1989).

Para la cría y mantenimiento de los adultos colectados para ensayos específicos de toxicidad o inducción de la reproducción, se confeccionó una jaula adecuada para individuos de la familia Hylidae según recomendaciones de los autores (Mattison 1987, Nace 1977, Staniszewski 1995, ASIH 2004). Específicamente, se construyó un ambiente propicio para la especie de 1,25 m de ancho x 0,75 m de alto x 1 m de profundidad con cierre puerta-ventana corrediza de aluminio y malla mosquitera. Dentro del terrario destinado para ejemplares adultos de *B. pulchella* se colocó como sustrato natural de compost orgánico, plantas ornamentales terrestres de crecimiento interior como *Cyperus* sp., *Dieffenbachia* sp., y *Epipremnum aureum* acuáticas como *Azolla* sp., *Hydrocotyle* sp., *Lemna gibba*, *Myriophyllum aquaticum* y *Polygonum* sp., con el fin de asemejarse a sus ambientes naturales. Además, se dispuso de un sistema lumínico regulado por fotoperiodo 16:8 h (luz:oscuridad) con tubos fluorescentes de 30 W, sumado a focos de luz UV e infrarroja, los que favorecen el crecimiento de las plantas y fortalecen el sistema óseo en anuros (Mattison 1987). También se colocó una pecera con agua de ensayo con bomba de agua conectada a un sistema de riego que simulaba el proceso de lluvias y mantenía la humedad necesaria para las ranas. A su vez, se añadió un sustrato de grava de diferentes tamaños en el fondo de la pecera que ayudaba al filtrado del agua para reducir los excesos de nitratos y nitritos. Por último, los ejemplares adultos de *B. pulchella* mantenidas en cautiverio fueron alimentados con larvas de *Tenebrio molitor*, y arácnidos, quironómidos, dípteros adultos, isópodos, y lepidópteros, suplemento dietario adecuado para la dieta de los hylidos (Da Rosa y col. 2011, Antoniazzi y col. 2013). Para evaluar la condición de bienestar en el cautiverio, se realizaron prospecciones generales de los individuos semanalmente, controlando variables para el cálculo de los índices de condición corporal evaluando su progreso y para evaluar su bienestar al comparar con los índices obtenidos de las poblaciones naturales en los ambientes muestreados. Sumado a esto, se realizaron pruebas para inducir la reproducción en laboratorio seleccionando 30 parejas, en las cuales se consideró sólo aquellas hembras que superaron el índice K pre-reproductivo estimado en $0,068 \pm 0,019$ para la especie ($n = 60$). Del total de las parejas, sólo 15 parejas fueron inducidas con la mezcla hormonal AMPHIPLEX (hormona gonadotrofina y una hormona antagonista de dopamina) mediante la inyección de 2 µl por gramo de rana siguiendo las recomendaciones de Trudeau y col. (2010) y posteriormente todas las parejas fueron acondicionadas en frascos de 3 l con la vegetación adecuada y 1,5 l de agua de bioensayo. Esta experimentación fue realizada por triplicado.

3.2.2. Método de captura y estudios en *Leptodactylus latinasus*

3.2.2.1 Muestreo de huevos, larvas y adultos

El muestreo de las poblaciones de *L. latinasus* se llevó a cabo mediante el método de cuadrantes paralelos considerando la distribución y el hábitat de la especie lo que permitió realizar el relevamiento de toda la población en el sitio de estudio. Asimismo, se utilizó la técnica de encuentros visuales, transectas auditivas y colecta manual. La metodología de cuadrantes para el relevamiento de la población se dispuso a lo largo de zonas de suelo descubierto o escasa vegetación que pertenecían a zonas de pastizales cercanas a humedales caracterizadas por ser zonas inundables, regiones típicas habitadas por la especie. En las zonas elegidas para aplicar la metodología, se realizó una búsqueda exhaustiva de nidos de espuma y adultos en cuevas que pudieran estar construidas a nivel del suelo descubierto o debajo de troncos, ramas, o piedras como se observa en la Fig. 10. I. Localizados los huevos o embriones, se realizó la colecta de una porción de las desovas (40-60%) con parte del sustrato y las mismas se colocaron en bolsas plásticas con agua declorinada y un volumen equivalente de aire para el traslado al laboratorio según recomendaciones oportunamente establecidas para la especie *B. pulchella* (sección 3.2.1.1). En el caso de observar larvas, se procedió a colectarlos y trasladarlos con la misma técnica descrita por Angulo y col. (2006). En adultos, al igual que en *B. pulchella*, se registró la actividad durante las épocas pre y post reproductivas y en los individuos colectados en cada caso se registró la LHC, la masa corporal, se les tomaron fotografías y fueron liberados. En este caso, el esfuerzo de captura fue de 4 h/hombre por sitio de muestreo y el esfuerzo total para la especie considerando todos los sitios fue de 20 h (Heyer y col. 1994). Aquellos individuos seleccionados para el traslado y mantenimiento en laboratorio fueron colectados y colocados en frascos de 3 l o bolsas plásticas con un 90% y 10% de aire y del sustrato húmedo, respectivamente, según las recomendaciones antes mencionadas (Angulo y col. 2006).

3.2.2.2 Cría y mantenimiento de huevos, larvas y adultos en laboratorio

En este caso, las larvas empleadas en los diferentes ensayos se obtuvieron a partir de nidos de espuma provenientes de los sitios previamente mencionados. Se siguieron los procedimientos de condiciones controladas de laboratorio mencionadas para *B. pulchella* en la sección 3.2.1.2. Las diferencias con respecto de la metodología aplicada en *B. pulchella* radicarón básicamente en los procedimientos de recolección de huevos ya que se realizaron mediciones de diferentes parámetros en las cuevas donde los nidos de espuma fueron depositados. Posteriormente con el empleo de una pala de mano se extrajo parte de la cueva con los nidos a fin de no dañar los huevos y de esa manera, con sustrato del sitio, fueron trasladados hasta el acondicionamiento en el laboratorio. Para la cría, debido a las particularidades propias de la especie, se tuvieron en cuenta las indicaciones de Basso y Kehr (1991). Además, fueron considerados diferentes

aspectos sobre el particular hábito de vida de la especie, basados en la experiencia propia sobre la cría de *L. latinasus*. Tanto embriones como larvas de *L. latinasus* fueron acondicionados en bateas plásticas de 30 l en una densidad de 30 larvas por batea (1 larva/l), en las cuales la limpieza y remoción de los individuos que estaban muertos fue realizada diariamente. Específicamente, en larvas de *L. latinasus* mantenidos en condiciones de laboratorio para la cría, se realizó control diario de la alimentación y la densidad de individuos, especialmente debido a las tasas elevadas de desarrollo y crecimiento que tiene la especie. La alimentación se realizó de la misma manera que se detalló en *B. pulchella* (ver sección 3.2.1.2) mientras que las mediciones para evaluar el crecimiento y desarrollo serán detallados más adelante en la sección 3.5.4.2. Otro aspecto considerado para el mantenimiento fue el grado de exposición e intensidad de luz, evitando la sobre exposición y controlando el correcto funcionamiento del fotoperiodo debido a que son especies cavícolas. Además, se colocaron recipientes plásticos de 500 ml que fueron ser utilizados como refugio por las ranas y además se constató que algunas ranas construyeron cuevas donde habitaban para refugiarse y en algunos casos para vocalizar. Sumado a esto, se realizó la limpieza de las bateas cada 48 h mediante filtración con remoción de 2/3 del agua de ensayo, lo cual evitaba la excesiva manipulación y disturbio de las larvas y el medio donde estaban contenidos. Por último, se controlaron los parámetros fisicoquímicos del agua mensualmente.

Para el mantenimiento de adultos de *L. latinasus*, fueron acondicionadas 4 peceras de 80 l contemplando los hábitos cavícolas de la especie según las consideraciones realizadas por Mattison (1987), Staniszewski (1995) y la ASIH (2004). Específicamente, fueron colocadas 12 ranas por pecera o terrario y cada pecera constaba de un tamaño promedio de 0,8 m de largo x 0,4 m de alto x 0,25 m de ancho con 15 cm de compost y filtros de grava de diferente tamaño como sustrato natural, que favorece la aireación del sustrato y evita la contaminación por acumulación de desechos orgánicos. Las condiciones lumínicas consideradas fueron las mismas que en *B. pulchella* (ver sección 3.2.1.2). Las condiciones de humedad eran monitoreadas diariamente evitando situaciones de estrés hídrico por escasez (que lleva a la desecación de los individuos) o por exceso (que favorece el aumento de enfermedades parasitarias o fúngicas). Estas ranas fueron alimentadas con larvas del gusano de la harina *Tenebrio molitor*, arácnidos, formícidos, himenópteros e isópodos adecuado a la dieta descrita para esta especie (Cuevas y Martori, 2007). Para evaluar la condición de bienestar en el cautiverio, se realizaban prospecciones generales de los individuos semanalmente, se les medían las variables correspondientes para el cálculo de los índices de condición corporal evaluando su progreso en el laboratorio. Por último, para evaluar su bienestar se realizaban comparaciones de los índices obtenidos en el laboratorio con los obtenidos de las poblaciones naturales en los ambientes muestreados. Finalmente, con el objetivo de lograr la reproducción de la especie en cautiverio se seleccionaron 20 parejas con hembras que superaron el índice K pre-reproductivo estimado en $0,078 \pm 0,009$ para la especie. Del total de las parejas ($n = 20$), sólo 10 parejas fueron inducidas de igual modo en que se explicó para *B. pulchella* (3.2.1.2). Posteriormente, todas las parejas fueron acondicionadas en frascos de 3 l que contenían la mitad del

recipiente con sustrato y cerrada con red media-sombra. Esta experimentación fue realizada por triplicado y repetida en los ambientes naturales colocando las ranas con y sin inducción en recipientes plásticos de 20 l enterrados en su totalidad y cubiertos por media-sombra.

3.3. Materiales empleados para los estudios ecotoxicológicos

Para realizar las exposiciones con el herbicida IMZT se utilizó formulación comercial Pivot® H (10,59% IMZT, CAS-RN: 81335-77-5) obtenida de BASF Argentina S.A. En el caso de los controles positivos, el dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , CAS-RN: 7722-84-1) para evaluar genotoxicidad *ex vivo* fueron obtenidos de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y la ciclofosfamida (CP, CAS-RN: 6055-19-2) utilizada para genotoxicidad *in vivo* fue conseguida de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.E.U.U). Las enzimas de restricción Endo III y Fpg se adquirieron de New England Biolabs® Inc. (Ipswich, MA, E.E.U.U). Todos los demás productos químicos y disolventes de calidad analítica para mediciones bioquímicas y el ensayo del cometa se compraron a Sigma Chemical Co. Las soluciones 0,1 M buffer fosfato Sörensen, el para-formaldehído y el glutaraldehído para la solución fijadora utilizada en el procesamiento histológico fueron adquiridos de Biopack Producto Químicos (Buenos Aires, Argentina). Por otro lado, los reactivos, soluciones y *kit* de historesina para realizar los procesamientos histológicos fueron obtenidos de Leica Biosystems (SP 05037-904, São Paulo, Brasil).

Los niveles de IMZT en las soluciones de ensayo se analizaron de acuerdo con el Informe de la U.S. Geological Survey 01-4134 mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en los laboratorios QV Chem Laboratorios (La Plata, Buenos Aires, Argentina) y en los laboratorios de Química Analítica del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Las muestras analizadas de las soluciones de ensayo con los ingredientes activos (0,39; 0,78; 1,17 y 1,63 mg/l) corresponden a los valores obtenidos inmediatamente después de la preparación de las soluciones de ensayo (0h) y después de transcurrido un día del bioensayo de toxicidad (24 h), antes de la renovación diaria. El límite de detección para IMZT fue 0,5 µg/l.

3.4. Metodología empleada para estudios ecotoxicológicos

3.4.1 Bioensayos de toxicidad con larvas

Con el objetivo de evaluar los efectos de IMZT en larvas, se realizaron diferentes bioensayos de toxicidad con ambas especies. En el caso de *B. pulchella*, se realizaron bioensayos de toxicidad: aguda y crónica, *in vivo* y *ex vivo* para evaluar el tipo de daño oxidativo en el ADN que produce el herbicida y de recuperación, para evaluar la capacidad de

resiliencia de larvas luego de una exposición aguda a IMZT. Mientras tanto, en larvas de *L. latinasus* se realizaron bioensayos de toxicidad aguda.

En todos los casos, para la evaluación de los puntos finales propuestos, las larvas fueron sacrificadas y las muestras extraídas de acuerdo con las directrices y protocolos detallados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garber y col. 2011) y considerando los procedimientos éticos del Comité de Ética de la Universidad Nacional de La Plata (código11/N619), el Marco Ético de Referencia para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Laboratorios, Granjas y Animales Silvestres (CONICET 2005) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (INTA 2008).

3.4.1.1 Bioensayos de toxicidad aguda

a. Condiciones del bioensayo

Para realizar los bioensayos de toxicidad aguda en ambas especies se siguieron los métodos estandarizados propuestos por la U.S. EPA (USEPA 1975, 2002a) y ASTM (ASTM 2007), con modificaciones menores informadas para anuros neotropicales (Natale y col. 2006, Vera Candioti y col. 2010). Específicamente se llevaron a cabo dos tipos de bioensayos de toxicidad aguda en larvas:

- Bioensayos de toxicidad aguda para evaluar efectos letales y subletales a nivel individual e histológico.
- Bioensayos de toxicidad aguda para evaluar efectos subletales a nivel bioquímico y citogenético.

Durante cada bioensayo de toxicidad aguda, las larvas se mantuvieron condiciones controladas de laboratorio (ver sección 3.2.1.2 y 3.2.2.2) en un cuarto aclimatado a una temperatura de 25 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16:8 h de luz y oscuridad. Se seleccionaron dos estadios de Gosner (1960) representativos de la fase de vida acuática, el GS25 para evaluar efectos letales y subletales y el GS36 para evaluar efectos letales y subletales a diferentes niveles de organización. Para un mejor entendimiento, el GS25 se seleccionó por ser el estadio de vida libre con la morfología larval completa y con reservas energéticas del vitelo que le permiten sobrevivir algunos días sin comer. El GS36 fue seleccionado debido a que en ese estadio en particular, las larvas se caracterizan por tener un gran tamaño que facilita la toma de muestras para medición de parámetros subletales y además ya presentan formación completa de sus sistemas y órganos hematopoyéticos y detoxificadores como se muestra en la Figura 7 (Capítulo 1, Pág. 59) (McDiarmid y Altig 1999).

Los bioensayos de toxicidad aguda semi-estáticos (96 h) se realizaron con renovación diaria (cada 24 h) de las soluciones de IMZT así como también se renovó el agua de bioensayo (sección 3.2) en los grupos controles y la solución de ciclofosfamida de los controles positivos. La preparación de las soluciones de IMZT se llevó a cabo obteniendo en primer lugar una solución madre estable de 1 g/l de IMZT a partir del formulado Pivot® H. Una vez obtenida la solución

madre, se realizaron diluciones en agua de ensayo para obtener las concentraciones especificadas anteriormente del bioensayo (USEPA 1975). Las larvas fueron mantenidas durante la fase experimental en frascos de vidrio de 500 ml (cámaras de experimentación), sin alimentación y expuestas en diferentes grupos experimentales a diferentes concentraciones de IMZT durante 96 h (Fig. 13A). Específicamente, se registraron diariamente las larvas que se encontraban muertas durante el recambio de soluciones de ensayo y fueron retiradas de las cámaras de experimentación para ser fijadas en frascos debidamente rotulados con formol 10%.

Todo el material utilizado fue lavado siguiendo un procedimiento estandarizado antes de cada bioensayo (APHA, 1998), consistiendo principalmente en un tren de lavado con una solución de NaOCl (10%), seguido del lavado con alcohol etílico 96°, posterior enjuague con agua de red y finalmente enjuague con agua destilada.

Para la evaluación de cada punto experimental, se realizaron experimentos utilizando cinco larvas ($n = 5$) por réplica y considerando un total de 4 réplicas por tratamiento, contabilizando así un total de 20 larvas por tratamiento o punto experimental. Por otro lado, todas las larvas fueron debidamente anestesiadas y posteriormente colocadas en solución fijadora Karnovsky, aquellas utilizadas para evaluar efectos subletales a nivel individual e histológico ($n = 20$, ver sección 3.5.4.2 y 3.5.3), o bien, colocadas en hielo (4 °C) y diseccionadas para evaluar los puntos finales subletales bioquímicos y citogenéticos ($n = 20$, ver sección 3.5.1 y 3.5.2), según el tipo de bioensayo agudo.

b. Bioensayos para evaluar efectos letales y subletales a nivel individual e histológico

Previamente a la exposición con IMZT, para evaluar efectos letales como subletales en larvas de ambas especies, se realizaron bioensayos preliminares de toxicidad aguda con el fin de estimar los límites de las concentraciones del herbicida dentro de las cuales se observan efectos letales y subletales y así establecer con mayor confiabilidad las concentraciones finales de los bioensayos finales de toxicidad aguda. En este sentido, a partir de la información obtenida de los bioensayos preliminares de toxicidad aguda, se llevaron a cabo bioensayos finales para evaluar efectos letales y subletales a nivel individual e histológico empleando larvas en GS25 y GS36.

En particular, larvas de *B. pulchella* en GS25 (LHC: $4,18 \pm 0,90$ mm; peso: $0,043 \pm 0,004$ g) fueron expuestas a IMZT en su formulación comercial Pivot® H a un intervalo de 11 concentraciones de IMZT (0,27; 0,41; 0,54; 0,68; 0,81; 0,87; 0,95; 1,02; 1,09; 1,22; and 2,72 mg/l) y las larvas en GS36 (LHC: $37,83 \pm 2,33$ mm; peso: $0,118 \pm 0,021$ g) fueron expuestas a un intervalo creciente de 9 concentraciones del formulado Pivot® H (0,41; 0,81; 1,09; 1,22; 1,36; 1,49; 1,63; 2,17; y 2,72 mg/l IMZT). En el caso de *L. latinasus*, luego de los bioensayos preliminares, las larvas en GS25 (LHC: $5,62 \pm 0,53$ mm; peso: $0,005 \pm 0,001$ g) fueron expuestas a 8 concentraciones crecientes del herbicida (0,27; 0,41; 0,68; 0,95; 1,36; 2,72; 3,25; y 4,89 mg/l IMZT) mientras que las larvas en GS36 (LHC: $26,68 \pm 1,19$ mm; peso: $0,248 \pm 0,043$ g) fueron

expuestas a 11 concentraciones crecientes del herbicida (0,07; 0,15; 0,22; 0,27; 0,29; 0,81; 1,22; 1,63; 2,72; 3,26; y 4,89 mg/l IMZT).

Para ambas especies, el grupo control negativo consistió de 4 réplicas conteniendo 5 larvas cada una. Cada cámara experimental de 500 ml del grupo control contenía agua de red declorinada o agua de bioensayo. El grupo control positivo consistió en exponer 5 larvas por réplica en cada cámara experimental a 23 mg/l de $K_2Cr_2O_7$. El dicromato de potasio se utiliza como control positivo de efectos letales para anuros locales según reportes los previos (Natale y col. 2006, Vera Candioti y col. 2010, Nikoloff y col. 2014b). Los grupos controles (negativos y positivos) fueron llevados a cabo en simultáneo con los tratamientos de larvas expuestas a IMZT.

Una vez concluidos estos bioensayos, aquellas larvas que permanecían vivas a las 96 h fueron extraídas de las cámaras de experimentación de cada tratamiento y fijadas en frascos debidamente rotulados para la posterior evaluación de los puntos finales subletales a nivel de organismo e histológicos (ver sección 3.5). Específicamente, se registró la mortalidad cada 24 h para obtener los parámetros ecotoxicológicos correspondientes a los valores de CL50 y NOEC-LOEC así como la curva concentración-respuesta (ver sección 3.5.4.1) y se evaluaron las respuestas de los parámetros a nivel de organismo tales como comportamiento, crecimiento, desarrollo y presencia de anormalidades morfológicas (detallados en la sección 3.5.4.2, 3.5.4.3 y 3.5.4.4) así como los puntos finales histológicos tales como la frecuencia de MMC e histopatologías (detallados en la sección 3.5.3). Los procedimientos para sacrificio y evaluación de puntos finales fueron realizados como describiré en la sección 3.5.4.2.

Sumado a esto, se realizaron ensayos de toxicidad aguda en un intervalo creciente de concentraciones de IMZT entre 0,27 y 4,89 mg/l en larvas de GS25 de otras especies pampeanas como *Ceratophrys ornata*, *Dendropsophus* sp., *L. latrans*, *Pseudopaludicola falcipes*, *R. arenarum*, *R. fernandezae*, y *Scinax squalirostris* que cohabitan con las especies de estudio. El objetivo de estos ensayos fue obtener los valores CL50 para cada especie pampeana y posteriormente construir la SSD de IMZT para anuros pampeanos que permita comparar la sensibilidad de las distintas especies y evaluar el riesgo ecológico de IMZT en ambientes pampeanos.

c. Bioensayos para evaluar efectos subletales a nivel bioquímico y citogenético

En los bioensayos de toxicidad para evaluar efectos subletales a nivel bioquímico y citogenético se emplearon larvas GS36. Estos bioensayos de exposición aguda a IMZT se realizaron de la misma manera que los bioensayos de toxicidad aguda previamente descriptos aunque con pequeñas modificaciones. Las modificaciones consistieron en utilizar sólo 3 concentraciones subletales equivalentes al 25%, 50% y 75% de la CL50 de cada especie luego de 96 h.

En este bioensayo, las larvas GS36 de *B. pulchella* fueron expuestas a 0,39; 0,78 y 1,17 mg/l de IMZT mientras que las larvas de *L. latinasus* fueron expuestas a 0,07; 0,15; y 0,22 mg/l de IMZT. Como fuera explicado anteriormente, en ambas especies cada grupo experimental consistió de 4 réplicas conteniendo 5 larvas por réplica ubicadas en las cámaras experimentales y los respectivos grupos control negativo y positivo. En particular, para este bioensayo el grupo control positivo consistió de 4 réplicas y cada réplica conteniendo 5 larvas expuestas a 40 mg/l de ciclofosfamida (CP). CP fue utilizada como control positivo de efectos genotóxicos según reportes previos realizados en anuros locales (Vera Candiotti y col. 2010, Nikoloff y col. 2014b). Los grupos controles (negativos y positivos) fueron llevados a cabo en simultáneo con los tratamientos de larvas expuestas a IMZT.

Por último, al finalizar los bioensayos de toxicidad aguda descriptos se realizaron sacrificios luego de las 48 y 96 h de exposición al herbicida para evaluar las respuestas bioquímicas y citogenéticas de los puntos finales. Los procedimientos para sacrificio y evaluación de puntos finales de este bioensayo fueron realizados como se describirá en la sección 3.5.2 y 3.5.3. Específicamente, se evaluaron las respuestas de los parámetros bioquímicos incluyendo la actividad enzimática de CAT, GST y AChE (detallados en la sección 3.5.2) así como para los puntos finales de citotoxicidad y genotoxicidad mediante el análisis de la inducción de MNs y otras anormalidades nucleares en eritrocitos y las rupturas de ADN de cadena simple en células circulantes sanguíneas mediante el ensayo cometa (detallados en la sección 3.5.1).

3.4.1.2 Bioensayo de toxicidad crónico

a. Condiciones del bioensayo

El bioensayo crónico se realizó en larvas de *B. pulchella* utilizando el método de flujo continuo (*flow trough*) descrito en los protocolos estandarizados para vertebrados acuáticos propuestos por la U.S. EPA (USEPA 2002b) y OECD (OECD 2009), con adaptaciones menores para la especie de estudio (Fig. 13B). Específicamente, el sistema de flujo continuo consistió en la entrada constante por goteo de la solución de exposición desde recipientes de 5 l hacia peceras de vidrio donde se encontraban las larvas de cada tratamiento. Las peceras utilizadas poseían una capacidad de 40 l y se colocaron 50 larvas de *B. pulchella* en GS25 para asegurar la densidad óptima de aproximadamente 1 larva/l de solución, logrando de esta manera un crecimiento óptimo y con el menor estrés.

De acuerdo con los protocolos de la OECD (2009), en este ensayo se evaluó el efecto de una concentración subletal de IMZT correspondiente al 12,5% de la CL50_{96h} obtenida para *B. pulchella* en los ensayos de toxicidad aguda. Para los controles negativos y positivos se utilizó agua de ensayo y 25 mg/l de CP, respectivamente. Cada grupo experimental (controles negativos, tratamientos con IMZT y control positivo de CP) comprendió 3 réplicas (3 peceras de 40 l) en las cuales las larvas recibieron alimentación diaria de 1 g / g de animal / día. En cada pecera se realizó la limpieza

diaria y la medición de los parámetros físico-químicos del agua de bioensayo durante cada recambio. En el caso que se detectaran organismos muertos en las revisiones diarias, eran retirados de las peceras y fijados debidamente en frascos con formol al 10%.

b. Exposición en bioensayo de toxicidad crónica

Para la exposición crónica, fue elegida una concentración de exposición a IMZT de 0,19 mg/l a partir del formulado comercial Pivot® H (10,59 g de IMZT / 100 ml), siendo ésta equivalente al 12,5% de la CL50 estimada para larvas de *B. pulchella*. La solución de exposición crónica a IMZT (0,19 mg/l) se preparó a partir de una solución madre de 1g/l de acuerdo al procedimiento de la U.S. EPA (1975) explicado anteriormente (sección 3.4.1.1).

Específicamente, la solución de exposición crónica a IMZT fue preparada al comienzo del ensayo y por primera vez en las peceras del grupo experimental correspondiente y posteriormente fueron colocadas las larvas. Una vez iniciado el ensayo, durante cada renovación, la preparación de la concentración crónica de IMZT ensayada fue realizada en 3 tanques de 15 l que conectaban separadamente a cada pecera réplica del tratamiento. La conexión de los tanques a las peceras se realizó a través de mangueras las cuales descargaban la solución de IMZT a un flujo continuo de 1 gota/seg y de esta manera permitir un recambio total de la solución cada 48 h (OECD 2009). Por otra parte, en este bioensayo, tanto el grupo control negativo como el positivo consistieron también de 3 réplicas y cada replica conteniendo 50 larvas en agua de bioensayo y expuestas a 25 mg/l de CP, respectivamente. Las soluciones de los grupos controles (negativos y positivos) fueron preparadas del mismo modo previamente descrito para los tratamientos con IMZT utilizando el método de flujo continuo y fueron llevados a cabo en simultáneo con los tratamientos de larvas expuestas a IMZT.

El inicio del bioensayo crónico comenzó a partir de lotes de larvas que habían alcanzado el GS25 y su finalización se decidió cuando el 80% de las larvas en el grupo control negativo alcanzaron la metamorfosis (GS 42), momento en el cuál se dio por finalizado el ensayo (USEPA 2002b, OECD, 2009). Los sacrificios para evaluar los puntos finales de interés comenzaron cuando las larvas del grupo control alcanzaron el GS36 y a partir de ese momento se realizaron sacrificios cada 7 días. En particular, los sacrificios se realizaron a los 28 (larvas del grupo control alcanzaron el GS36), 35, 42 y 49 días de transcurrido en ensayo siendo la duración total del ensayo de 49 días.

Por otra parte, en cada tiempo de sacrificio considerado se realizó la medición de puntos finales individuales tales como desarrollo, crecimiento y presencia de anormalidades morfológicas, y de los puntos finales de cito y genotoxicidad como la frecuencia de MNs, otras anormalidades morfológicas nucleares y evaluación del daño en el ADN mediante el EC. La metodología de análisis de todos los puntos finales se detalla más adelante en la sección 3.5. En particular, para el

análisis de los puntos finales a nivel de organismo se tuvo en cuenta el diseño experimental de ensayos crónicos previos realizados en anuros (Bridges 2000, Bernabò y col. 2016).

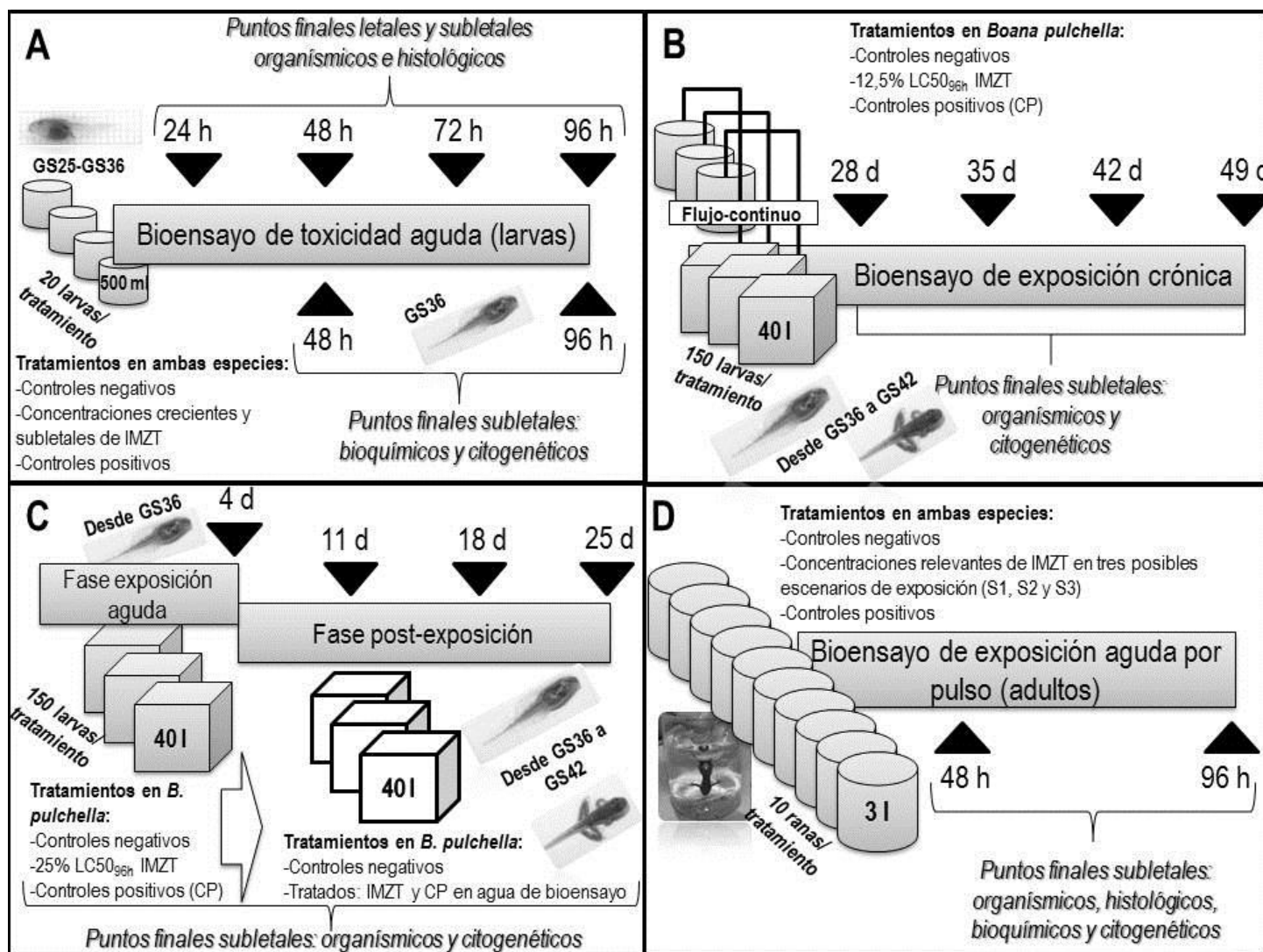


Figura 13. Diferentes bioensayos empleados en larvas de anuros: agudos (A), sistema de flujo continuo en ensayo crónico (B), de recuperación (C) y en adultos por exposición de pulso agudo (D).

3.4.1.3 Bioensayos para evaluar el daño oxidativo en el ADN

a. Procedimientos para el bioensayo

Para evaluar si el tipo de daño producido por IMZT en la cadena de ADN estaba vinculado con efectos oxidativos en sus bases, se utilizó la metodología del ensayo cometa modificado utilizando enzimas de restricción en larvas de *B.*

pulchella mediante ensayos de exposición *in vivo* y *ex vivo* (Figura 13A). Específicamente, se evaluó el tipo de daño oxidativo producido por el herbicida aplicando el EC modificado con las enzimas de restricción Endo III que reconoce pirimidinas oxidadas y Fpg que reconoce y elimina purinas oxidadas en el ADN. El procedimiento y fundamento de esta metodología será detallado en la sección 3.5.1.2 tanto para la exposición *in vivo* como *ex vivo*.

b. Exposición aguda *in vivo*

La exposición *in vivo* se realizó utilizando una concentración correspondiente al 25% de la CL50_{96h} estimada y equivalente a 0,39 mg/l de IMZT a partir de los bioensayos de exposición aguda en larvas GS36. Esta concentración fue capaz de inducir daño en las cadenas de ADN luego de realizados los bioensayos agudos de exposición en los que se evidenciaron efectos subletales a nivel bioquímico y citogenético.

Este bioensayo fue desarrollado de igual manera al detallado previamente en la sección 3.4.1.1c. A modo de resumen, 20 larvas en GS36 fueron expuestas a 0,39 mg/l de IMZT, mantenidas en cámaras de experimentación de 500 ml sin ser alimentadas durante las 96 h del bioensayo. Sumado a esto, se prepararon y expusieron en simultáneo 20 larvas (4 réplicas de 5 larvas c/u) correspondientes al grupo control negativo (agua de bioensayo). Todas las soluciones de experimentación fueron preparadas al comenzar el bioensayo y renovadas completamente luego de 24 h. Según los criterios explicados anteriormente (sección 3.4.1.1), los sacrificios fueron realizados luego de transcurridas 48 y 96 h de exposición para evaluar el daño oxidativo en el ADN por la metodología del ensayo cometa modificado en células sanguíneas circulantes de las larvas de *B. pulchella*.

c. Exposición *ex vivo*

En el bioensayo de exposición *ex vivo*, el procedimiento para evaluar el daño oxidativo en el ADN consistió en extraer las células sanguíneas circulantes de larvas de *B. pulchella* en GS36 provenientes de la cría y mantenimiento en cautiverio. Este bioensayo se desarrolló con el fin de corroborar los efectos observados en el bioensayo *in vivo*, dado que este tipo de bioensayo se recomiendan utilizar al momento de evaluar las enzimas Fpg y EndoIII y además se ha probado su eficaz funcionamiento en las evaluaciones del daño oxidativo en el ADN. En este ensayo, fueron utilizadas 10 larvas por tratamiento. Las larvas fueron sacrificadas a la altura del opérculo y posteriormente sumergidas en 1ml de PBS para la extracción de las células sanguíneas. Una vez extraídas, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 9 min y resuspendidas en 50 µl de PBS obteniendo un volumen final de suspensión celular de 100µl. Mediante un hemocitómetro Neubauer se realizó la cuantificación de células contenidas en la suspensión celular para luego calcular y obtener una

densidad final de $3,6 \times 10^6$ células/ml por muestra. Sobre el volumen final de suspensión celular contenida en tubos de microcentrifuga de 1ml se realizó la exposición *ex vivo* a IMZT en 10 muestras provenientes de diferentes larvas por punto experimental.

La exposición *ex vivo* constó de preparar una solución de 0,39 mg/l de IMZT (según fue detallado en la sección 3.4.1.1) y colocar 50 μ l de esa solución sobre cada suspensión celular (10 muestras). El tiempo de exposición *ex vivo* al herbicida fue de 1 h a temperatura ambiente (25°C) en atmósfera húmeda. En este caso, los controles negativos fueron células sanguíneas circulantes provenientes de diferentes larvas y dichas suspensiones celulares permanecieron durante 1 h en tubos de microcentrifuga de 1 ml conteniendo PBS. En tanto, como control positivo se utilizó una concentración de 50 μ M de H_2O_2 como agente oxidante del ADN en ambos ensayos (*in vivo* y *ex vivo*) y la exposición consistió en colocar 50 μ l de la solución H_2O_2 sobre cada suspensión celular ($n= 10$). El tiempo de exposición para el control positivo fue de 5 min a 25 °C (Collins y Azqueta 2012). Sumado a esto, fueron preparados controles de buffer ($n= 10$) para evaluar la posible inducción de daño ocasionado por el buffer de las enzimas de restricción. En este caso, fueron preparados 2 grupos control de buffer que consistieron en colocar 50 μ l del buffer de enzima (40 mM de HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/ml albúmina de suero bovino; pH = 8,0) sobre las células contenidas en portaobjetos e incubar dichos grupos control en cámara húmeda a 37 °C durante 30 y 45 min como controles de Fpg y Endo III, respectivamente. Las especificaciones particulares sobre la exposición e incubación con las enzimas de restricción, las cantidades empleadas de las mismas y las condiciones consideradas para llevar a cabo el EC modificado con enzimas de restricción serán detalladas más adelante en la sección 3.5.1.2.

3.4.1.4 Bioensayos para evaluar las capacidades de recuperación en larvas de *Boana pulchella*

a. Condiciones del bioensayo

El diseño experimental del bioensayo de recuperación se basó en trabajos previos realizados en larvas de anfibios (Bernabò y col. 2013, Mouchet y col. 2015) con modificaciones menores para la especie de estudio. El objetivo del bioensayo de recuperación fue evaluar la capacidad de resiliencia (o recuperación) de larvas de *B. pulchella* en GS36 expuestas durante un periodo agudo a IMZT y luego colocadas en agua de bioensayo sin contaminante hasta la metamorfosis. Para evaluar la capacidad de recuperación en larvas de la especie se utilizaron puntos finales citogenéticos e individuales como herramientas de alerta temprana frente a posibles efectos adversos de los estresores ambientales.

Específicamente el bioensayo constó de dos fases consecutivas:

1. Fase aguda de exposición a IMZT a una concentración subletal de conocido daño citogenético.

2. Fase de post-exposición en agua de bioensayo sin herbicida hasta que las larvas previamente expuestas alcancen la metamorfosis.

En la primera fase, se realizó una exposición aguda de las larvas a 0,39 mg/l de IMZT durante 4 días con los respectivos grupos controles. Por otra parte, la segunda fase consistió de un período posterior a la exposición aguda donde las larvas previamente expuestas a IMZT fueron colocadas en peceras con agua de bioensayo sin IMZT durante 21 días (Figura 15C). La duración total del bioensayo fue de 25 días, desde el inicio de la fase de exposición aguda hasta el momento en que aproximadamente el 80% de las larvas dentro del grupo control alcanzó el GS42, situación que marcó la finalización del bioensayo (*fase de post-exposición*). Los bioensayos se realizaron con larvas de *B. pulchella* provenientes de la cría y mantenimiento en laboratorio una vez que éstas alcanzaron el GS36 (GS35-GS37). Conjuntamente con los tratamientos de IMZT se expusieron grupos controles negativos (agua de bioensayo) y positivos (40 mg/l CP). Para cada tiempo de sacrificio de la *fase de exposición aguda* y de la *fase de post-exposición*, fueron estimados los efectos subletales de nivel de organismo tales como el crecimiento, masa corporal, el estadio de desarrollo (según Gosner 1960) y anomalías morfológicas así como los efectos subletales a nivel citogenético tales como la inducción de MNs y otras alteraciones nucleares de eritrocitos y los daños en la cadena de ADN de células sanguíneas circulantes por el EC para cada tratamiento (ver sección 3.5). Para evaluar los mencionados puntos finales subletales de interés fueron sacrificadas 15 larvas de cada grupo experimental luego de 4 días en la *fase de exposición* y cada 7 días luego de ingresar en la *fase de post-exposición*. En síntesis, desde el comienzo del bioensayo (0 d) y hasta el final de mismo (25d) las larvas fueron sacrificadas al día 4 (fin de la *fase de exposición aguda*) y a los días 11, 18 y 25, durante la *fase de post-exposición* (Figura 13C).

b. Fase de exposición aguda

La fase de exposición consistió de colocar larvas de *B. pulchella* durante 4 días a una concentración subletal de IMZT equivalente a 25% del valor de CL50_{96h} de Pivot® H que produce efectos adversos a nivel citogenético y de organismo según los bioensayos agudos previamente realizados. En este experimento, el bioensayo de toxicidad aguda fue llevado a cabo del mismo modo que se explicó en la sección 3.4.1.1, con algunas modificaciones. Principalmente, cada tratamiento consistió en exponer por triplicado a 50 larvas (GS36) a una concentración de IMZT de 0,39 mg/l, colocadas en peceras de vidrio de 40 l. La concentración seleccionada representó la menor concentración de IMZT evaluada capaz de inducir un aumento significativo en los diferentes efectos subletales tales como anomalías morfológicas, MNs y daño en el ADN.

De la misma manera que los tratamientos con IMZT se prepararon los grupos controles negativos (larvas en agua de bioensayo) y positivos (larvas expuestas a 40 mg/l de CP) colocando 50 larvas por réplica en peceras de 40 l a las mencionadas soluciones. Ambos grupos controles se llevaron a cabo por triplicado y en simultáneo con las larvas expuestas a IMZT. Todas las soluciones de ensayo se prepararon al comienzo del bioensayo agudo y se reemplazaron cada 24 h. La mortalidad se registró diariamente. Durante esta fase las larvas no fueron alimentadas (Fig. 13C).

c. Fase de post-exposición

La fase de post-exposición se realizó siguiendo los procedimientos para larvas de anfibios descritos previamente por Mouchet y col. (2015) y Bernabó y col. (2013), con menores modificaciones. Específicamente, para evaluar las capacidades de recuperación a nivel citogenético de larvas de *B. pulchella* se utilizaron adaptaciones de los procedimientos realizados por Mouchet y col. (2015) mientras que los efectos subletales a nivel de organismo tales como el crecimiento, desarrollo, masa corporal y anomalías morfológicas fueron analizados siguiendo los procedimientos de Bernabó y col. (2013). Brevemente, en esta fase del bioensayo se utilizaron aquellas larvas que previamente habían sido expuestas a IMZT y CP. Estas larvas previamente expuestas a los mencionados estresores ambientales fueron colectadas en redes de mano, trasladadas en bolsas con agua de bioensayo y colocadas en peceras de vidrio de 40 l que contenían agua de bioensayo libre de IMZT o CP con aireación suave y continua según los protocolos indicados. El final de la *fase de post-exposición*, y por ende el final del bioensayo de recuperación, ocurrió cuando el 80% de las larvas dentro del grupo control negativo alcanzó el GS42. Durante esta fase las larvas fueron alimentadas cada 2 días de la misma manera mencionada para el ensayo crónico (sección 3.4.1.2). El volumen total de agua de bioensayo (libre de IMZT y CP) fue renovada cada 3 días.

3.4.2 Bioensayos con adultos de *Boana pulchella* y *Leptodactylus latinasus*

La exposición experimental a IMZT en ranas adultas de ambas especies se llevó a cabo teniendo en cuenta el modo de exposición utilizado por Wang y Jia (2009) y Van Meter y col. (2014, 2015) con modificaciones menores adaptadas a la aplicación IMZT en su formulado comercial y al hábito de vida de ambas especies.

Para llevar a cabo este bioensayo fueron considerados posibles escenarios de relevancia ambiental de exposición a IMZT. Para el diseño experimental se utilizó la vía de exposición dérmica en ranas debido a que este modo de ingreso de estresores ambientales es un proceso que maximiza la absorción de los mismos a través de la dermis, tejido altamente permeable en anfibios (Quaranta y col. 2009).

Para la evaluación de los efectos de IMZT en cada escenario se utilizaron diferentes puntos finales a varios niveles de organización biológica tales como individual o de organismo (índices morfométricos), histológicos (histopatologías y pigmentación hepática), bioquímicos (CAT, GST y AChE) y citogenéticos (MNs y otras anormalidades nucleares de eritrocitos y EC), los cuales fueron evaluados a dos tiempos (48 y 96 h) luego del pulso agudo y son descriptos en detalle en la sección 3.5 (Fig. 13D).

a. Modos de exposición dérmica en ambas especies

Para realizar la exposición dérmica a IMZT en adultos de ambas especies fueron considerados tres escenarios de descriptos a continuación:

- Primer escenario o S1: Se simuló una situación de ingreso del herbicida por escorrentía superficial (*runoff*) a los sitios reproductivos de la especie. Es importante señalar que la cantidad de IMZT transportada por escorrentía no excede el 3% del total aplicado luego de intensas lluvias (Dias Martini y col. 2013). En este escenario particular la concentración de IMZT ensayada fue equivalente a 10 mg/l.
- Segundo escenario o S2: fue considerada una situación de aplicación directa del herbicida en las hojas donde *B. pulchella* reposa y en la cual una décima parte (1/10) de la concentración de IMZT aplicado alcanzaría a las ranas. En este caso, la concentración ensayada de IMZT fue equivalente a 100 mg/l.
- Tercer escenario o S3: se evaluó un escenario considerado como la peor situación de exposición en la cual las ranas sufren una aplicación directa a Pivot® H a la concentración recomendada por el fabricante del producto (por ejemplo, las ranas son rociadas directamente por el aplicador) (Van Meter y col. 2014). Para este tipo de exposición, las ranas fueron expuestas a 1000 mg/l de IMZT.

En particular, para *B. pulchella* fueron considerados los tres escenarios de exposición mientras que para los adultos de *L. latinasus*, debido a su particular hábito de vida, sólo fueron considerados dos escenarios posibles de exposición: S1 (escorrentía superficial de IMZT por lluvias y posterior inundación de las cuevas y ambientes donde *L. latinasus* se reproduce y/o habita) y S3 (la rana emerge de la cueva y es rociada directamente con herbicida por el fumigador).

En ambas especies, se emplearon un total de diez ranas por tratamiento ($n = 10$) para cada tiempo de exposición evaluado (48 y 96 h). En cada tratamiento, las ranas fueron expuestas a un pulso agudo que consistió en sumergirlas durante 15 segundos (asegurando que todo el animal estuviese sumergido en la solución) a una concentración de Pivot® H (10,59 g/l de IMZT) definida por el escenario de exposición considerado. Las soluciones de ensayo a partir de una solución madre fueron preparadas según los procedimientos previamente descriptos en la sección 3.4.1.1. Los controles negativos y positivos fueron agua de bioensayo y 50 mg/l de CP, respectivamente, utilizando la exposición dérmica por inmersión y en un pulso agudo como vía de ingreso. Después del pulso de exposición, cada rana se colocó individualmente en frascos de

vidrio de 3 l con 200 cm³ de compost orgánico y se colocó una red media-sombra con banda elástica en la boca del frasco que permitía la aireación y evitaba el escape de la rana.

b. Procesamiento de las muestras

Para evaluar los puntos finales propuestos para cada tiempo de exposición en las ranas adultas se realizó la extracción de las muestras de la siguiente manera. Las ranas fueron anestesiadas, luego colocadas en hielo a 4 °C y finalmente se realizó la disección de las mismas para la extracción de los tejidos y órganos de interés de acuerdo con las directrices y protocolos detallados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garber y col. 2011) y considerando los procedimientos éticos del Comité de Ética de la Universidad Nacional de La Plata (código11/N619), el Marco Ético de Referencia para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Laboratorios, Granjas y Animales Silvestres (CONICET 2005) y Guía para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (INTA 2008).

3.5. Puntos finales evaluados

3.5.1. Nivel citogenético: MNs, anormalidades nucleares y ensayo cometa

3.5.1.1 Análisis de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares

a. Procesamiento de la muestra

La técnica para evaluar MNs y otras anormalidades nucleares se realizó en eritrocitos maduros de sangre circulante periférica tanto de larvas como adultos de ambas especies. Los procedimientos de la técnica se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita previamente para especies de anuros (Vera Candioti y col. 2010, Nikoloff y col. 2014a, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014). Un total de 15 larvas y 10 adultos por tratamiento fueron seleccionados y sacrificados luego de cada tiempo de exposición considerado (48 y 96 h) según los criterios previamente descriptos (ASIH 2004). Para la obtención de las muestras de sangre, las larvas fueron sacrificadas realizando una incisión con bisturí detrás del opérculo (zona inferior al disco oral con la larva en posición ventral) y en los adultos, previamente anestesiados, se realizó una incisión ventral a la altura del corazón para luego extraer la sangre por punción cardíaca.

A partir de las muestras de sangre obtenidas se realizaron extendidos de sangre en portaobjetos limpios y previamente rotulados. Posteriormente, los portaobjetos fueron secados en posición vertical a temperatura ambiente (25 °C), fijados con metanol frío (4°C) al 100% (v/v) durante 20 min y finalmente teñidos en solución de Giemsa al 5% durante 12 min para el posterior análisis de MNs y otras anormalidades nucleares en eritrocitos de cada larva o individuo adulto.

b. Criterios para recuento de MNs y otras anormalidades nucleares

Los conteos de los MNs y otras anomalías nucleares en los extendidos de muestras de sangre de larvas y adultos fueron realizados en magnificación de 1.000x y los datos fueron expresados como el número total de MNs por 1.000 células. La frecuencia de MNs se determinó a las 48 y 96 h luego del tratamiento inicial. Los criterios utilizados para identificar un MNs fueron los siguientes (Vera Candiotti y col. 2010):

- a. Deben poseer un diámetro menor que un tercio ($1/3$) del núcleo principal,
- b. No deben tener refractabilidad,
- c. Deben tener la misma intensidad de tinción y luminosidad que el núcleo principal,
- d. No deben tener conexión o contacto con el núcleo principal y deben tener un límite distinguible del límite del núcleo principal,
- e. No deben estar superpuestos con el núcleo principal y
- f. No deben existir más de cuatro MNs por célula.

Por otro lado, para análisis y clasificación de otras anomalías nucleares, los criterios de examinación fueron los siguientes (Nikoloff y col. 2014):

- a. Las células con dos núcleos fueron consideradas como BNs,
- b. Aquellas células con un núcleo que presenta una pequeña evaginación de la membrana que contiene cromatina fueron clasificadas como gemaciones (Buds),
- c. Las células que presentaban uno o varios lóbulos en los núcleos producto de evaginaciones de la membrana nuclear, y con mayor tamaño que los Buds, fueron consideradas como NLs,
- d. Las células que presentaban núcleos vacuolados con evidente pérdida de material nuclear fueron considerados como HNs (en este caso particular los núcleos pueden presentar una morfología arriñonada) y
- e. Finalmente, aquellas células donde el núcleo estaba ausente fueron consideradas como EPs.

3.5.1.2 Cuantificación de la inducción de rupturas de cadena simple y daño oxidativo en el ADN mediante el ensayo cometa

a. Procedimiento de la metodología del EC

Para evaluar la genotoxicidad inducida por IMZT a nivel del ADN de las especies de estudio se utilizó la metodología del EC o SCGE. Para llevar a cabo esta metodología se obtuvieron muestras de sangre a partir de los sacrificios previamente realizados en los mismos individuos empleados para el ensayo de MNs (ver sección 3.5.1.1). El EC

se realizó del mismo modo en larvas y adultos de ambas especies, siguiendo los procedimientos alcalinos descriptos previamente para larvas de anuros (Nikoloff y col. 2014a, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014).

- *Obtención de las muestras*: Específicamente, para poder desarrollar la metodología del EC fue necesario colocar 10 μ l de sangre (por individuo) en 1 ml de buffer fosfato salino (2 g NaCl; 0,05 g KCl; 0,035 g KH_2PO_4 ; 0,227 g Na_2HPO_4 ; 250 ml H_2O destilada a pH 7,4 – 7,5) (Figura 14, 1-2). Obtenida la dilución de la muestra en PBS fue centrifugada durante 9 min a 2000rpm.

- *Preparación de las muestras en geles de agarosa*: Una vez centrifugada la muestra, se descartó el sobrenadante y las células en un volumen de 30 μ l de PBS fue resuspendida en 70 μ l de ABPF al 0,5%. Con los 100 μ l de muestra con ABPF se preparó la segunda capa de agarosa colocando este volumen sobre un portaobjeto debidamente rotulado que poseía una primera capa previamente preparada con 100 μ l de APFN al 0,5%. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos y fueron trasladados a 4°C durante 10 min con el fin de solidificar la segunda capa (Figura 14, 3). Luego de la solidificación de la segunda capa, cada cubreobjetos fue retirado y sobre esta segunda capa se preparó la tercera capa de agarosa colocando 50 μ l de ABPF al 0,5%. Finalmente, se colocó nuevamente un cubreobjetos y estos preparados fueron trasladados a 4 °C durante 10 minutos para su posterior solidificación.

- *Lisis celular*: Solidificada la tercera capa, se retiró cada cubreobjetos de los portaobjetos conteniendo la muestra individuales de cada larva y cada preparado fue colocado en vasos coplins conteniendo solución de lisis a 4 °C (1% de sarcosinato de sodio; 2,5 M ClNa; 100 mM Na_2EDTA ; 10 mM Tris; pH = 10; 1% Triton X-100; 10% DMSO) y en esa solución permanecieron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad (Figura 14, 4).

- *Desenrollamiento del ADN y electroforesis*: Transcurrido el tiempo de lisis, los portaobjetos fueron ubicados en posición horizontal sobre la cuba de electroforesis que con buffer específico de electroforesis para esta variante alcalina del EC (950 ml H_2O destilada; 1 mM Na_2EDTA ; 300 mM NaOH; pH = 13) y allí permanecieron los preparados durante 25 min a 4 °C para el proceso de desenrollamiento del ADN. Luego del desenrollamiento del mismo y para lograr la migración del ADN, los portaobjetos fueron sometidos a una corrida de electroforesis (25 V y 250 mA) en el mismo buffer a 4° C durante 20 min (Figura14, 5-6).

- *Enjuague y deshidratación de las muestras*: Finalmente y luego de la corrida electroforética, los portaobjetos fueron neutralizados con tres enjuagues de la solución Tris-HCl (0,4 M; pH 7,5) y deshidratados en alcohol 96% durante 5 min para ser guardados en oscuridad hasta su análisis (Figura 14, 7-8).

- *Observación y cuantificación a microscopio*: Los preparados deshidratados fueron coloreados con 10 μ l de 4',6-diamino-2-fenilindol o DAPI (Vectashield Mounting Medium H1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y examinados en microscopio de fluorescencia Olympus BX50 de filtro WB con cámara acoplada (Fig. 14, 9).

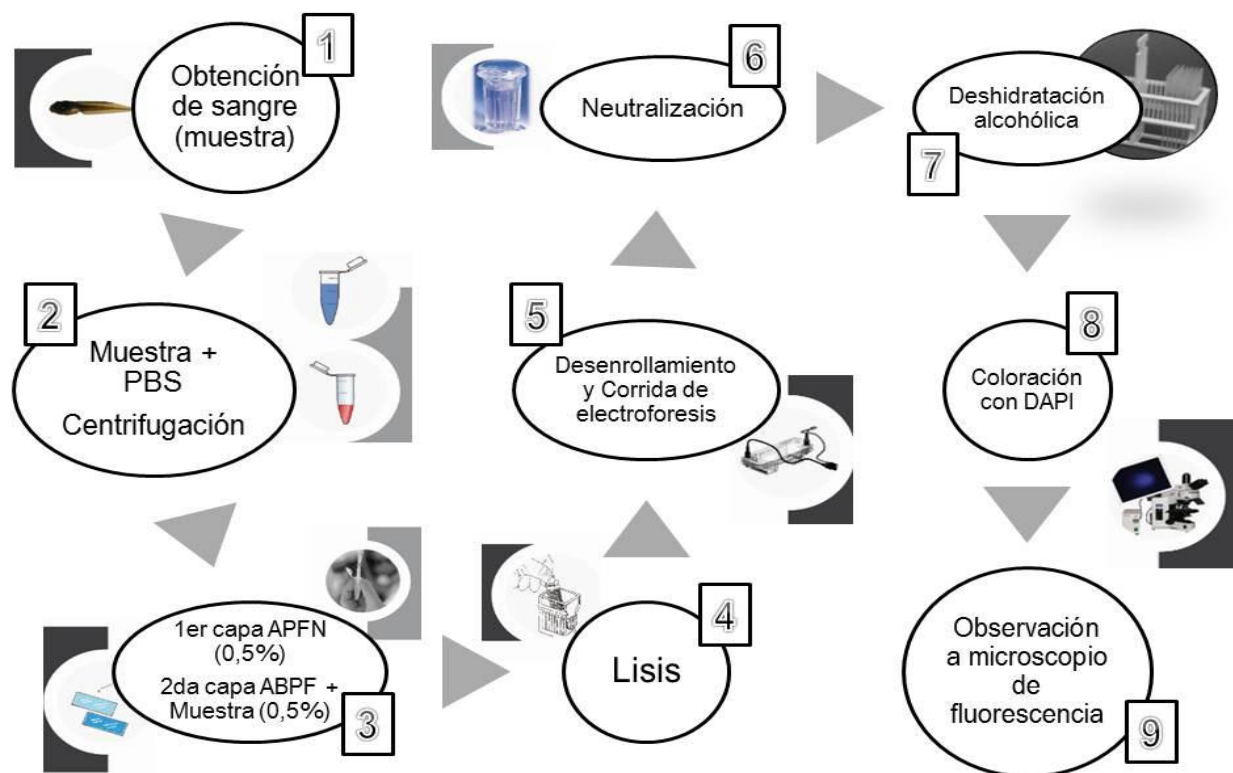


Figura 14. Representación de nueve etapas llevadas a cabo aplicando la técnica del ensayo cometa para evaluar el daño en las cadenas de ADN ejercido por el herbicida IMZT en larvas de anuros.

b. Análisis y cuantificación del daño genético

Para la cuantificación de la magnitud del daño en el ADN se consideró la longitud de migración e intensidad del ADN determinado visualmente en 100 nucleoides de células sanguíneas seleccionadas aleatoriamente y no superpuestas. Según la longitud de la migración del ADN, la magnitud del daño se clasificó en cinco clases o categorías de nucleoides propuestas por Çavaş y Könen (2007) con leves modificaciones (Figura 15):

- Categoría 0-I: nucleoides no dañados, donde no existe migración del ADN o el mismo no supera el diámetro del núcleo;
- Categoría II: nucleoides con daño mínimo, con migración del ADN igual o mayor al diámetro del núcleo;
- Categoría III: nucleoides con daño medio, la migración del ADN es igual o superior a dos diámetros del núcleo; y
- Categoría IV: nucleoides con daño máximo, aquí la migración de ADN es igual o supera tres diámetros del núcleo.

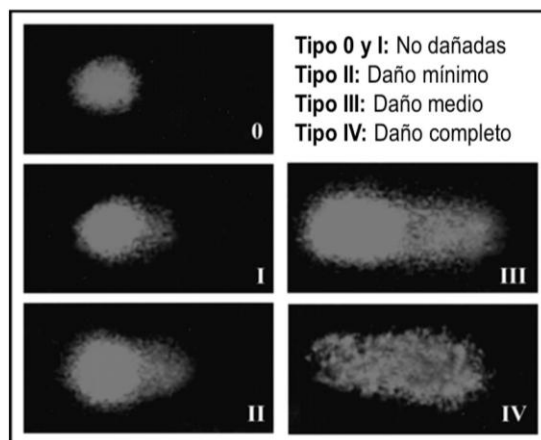


Figura 15. Clasificación de los cometas formados en eritrocitos de vertebrados acuáticos. 0-I, Categoría 0 y 1 (no dañadas); II, Categoría 2 (daño mínimo); III, Categoría 3 (daño medio) y IV, Categoría 4 (daño máximo). Modificado de Çavaş y Könen (2007).

Los datos se expresan como el promedio de nucleoides dañados (sumatoria de clases II, III y IV) para cada tratamiento. A partir de estos datos es posible calcular el índice de daño genético (IDG) para cada tratamiento utilizando la fórmula de Pitarque y col. (1999a): $IDG = [I(I) + 2(II) + 3(III) + 4(IV) / N(0-IV)]$, donde 0—IV representa el tipo de nucleoides, y N0—NIV representan el número total de nucleoides registrados.

c. Modificación del EC para evaluar el daño oxidativo en el ADN

Por otro lado, para el EC modificado con enzimas de restricción *ex vivo* se utilizó la metodología propuesta por Collins y col. (1996) y Guilherme y col. (2012) con adaptaciones mínimas para *B. pulchella*. En este caso, desde la formación de la primera capa de agarosa hasta la lisis celular en los vasos coplins, la técnica del EC modificado se realiza del mismo modo descrito anteriormente en el EC convencional de su versión alcalina (sección 3.5.1.2a). Sin embargo, a diferencia de éste, luego de la lisis comienzan los tratamientos con las enzimas de restricción. Específicamente, luego de la lisis celular, los portaobjetos fueron retirados de la solución y enjuagados en tres oportunidades cada 5 min con el buffer de incubación para las enzimas (40 mM de HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/ml albúmina de suero bovino; pH = 8,0) a temperatura ambiente (25 °C). Luego de estos enjuagues, se retiró el exceso de líquido y los portaobjetos con las muestras fueron expuestos a los tratamientos con las enzimas de restricción EndoIII y Fpg, diluidas en buffer de enzima 1:1000 y 1:3000, respectivamente, según las recomendaciones del proveedor de las enzimas. Particularmente, los tratamientos con enzimas consistieron en incubar en cámara húmeda los preparados con 50 µl de EndoIII (0,5 U) durante 30 min y con 50 µl de Fpg (0,13 U) durante 45 min (Collins y col. 1996, Collins 2004)

Por último, se calculó el daño oxidativo en el ADN (DO) para cada tratamiento, utilizando la fórmula $DO = [(\%IDG \text{ buffer} + \%IDG \text{ enzima} + \%IDG \text{ herbicida}) - (\%IDG \text{ buffer} + \%IDG \text{ herbicida})]$, siguiendo criterios predeterminados (Domijan y col. 2006, Mikloš y col. 2009, Collins y Azqueta 2012).

3.5.2. Nivel bioquímico: Biomarcadores de estrés oxidativo hepático

a. Procesamiento de las muestras

Todos los procedimientos para evaluar la actividad enzimática en anuros se realizaron de acuerdo a los protocolos propuestos por Brodeur y col. (2011, 2012) con modificaciones leves para larvas de anfibios y análisis microplacas.

- *Preparación de las muestras*: las larvas sacrificadas a las 48 y 96 h para los análisis bioquímicos fueron colocadas en frascos que contenían 5 ml de PBS a 4 °C y luego fueron preservadas junto con los hígados de las ranas adultas a -80 °C hasta realizar los análisis enzimáticos correspondientes.

- *Homogeneización de las muestras*:

Para el análisis enzimático en larvas fue necesario realizar homogenatos de 1 larva de *B. pulchella* y 2 larvas de *L. latinasus*, las cuales fueron colocadas en tubos de ensayos conteniendo 500 y 300 µl de buffer de homogeneización (pH = 7,4; 50 mM buffer tris (hidroximetil) amino-metano que contiene 1 mM EDTA y 0,25 M sacarosa; 4 °C), respectivamente.

En el caso de los adultos, para la homogeneización se utilizaron aproximadamente 50 mg de hígado por individuo (correspondiente a dos tercios del órgano y el tercio restante fue destinado a análisis histológico) que fueron colocados en tubos de ensayos con 2 ml de buffer de homogeneización a 4 °C. Para realizar los homogenatos de larvas e hígados de adultos se utilizó un homogeneizador de teflón Potter-Elvehjem (Buenos Aires, Argentina).

Centrifugación y obtención de la fracción enzimática de las muestras: una vez obtenido el homogenato, las muestras fueron centrifugadas a 10.000x g (10 min, 4 °C) con el objetivo de remover los núcleos y desechos celulares y obtener la muestra de análisis de interés (sobrenadante). El sobrenadante colectado se fraccionó en alícuotas de 150 o 200 µl en tubos de microcentrifuga y cada fracción de sobrenadante fue utilizada para diferentes mediciones enzimáticas y proteicas según correspondiera. Para la preparación de todas las reacciones enzimáticas y para la construcción de la curva de calibración de proteínas totales presentes en la muestra se incubó cada muestra en microplacas y finalmente se realizó la lectura de las actividades enzimáticas y de la concentración de proteínas en lector de microplaca SPECTROstar Nano (BMG Labtech).

b. Medición de proteínas en larvas y adultos

La concentración de proteínas totales en muestras de larvas y adultos fueron determinadas por el método de Lowry (1951) utilizando albúmina de suero bovino como patrón estándar. La porción de homogenato utilizada para la determinación de enzimas en larvas fue una dilución 1/10 (20 μ l muestra pura diluida en 180 μ l de PBS) y 1/2 del homogenato en PBS (100 μ l muestra pura diluida 100 μ l de PBS, pH 7) para *B. pulchella* y *L. latinasus*, respectivamente.

En el caso de adultos, para la medición de proteínas se utilizaron 200 μ l de una dilución entre homogenato puro/PBS (pH= 7), que correspondió a una dilución 1/20 (50 μ l muestra pura en 950 μ l de PBS) en muestras de *B. pulchella* y 1/25 (40 μ l muestra pura en 960 μ l de PBS) para *L. latinasus*. Tanto en larvas como en adultos los resultados de la actividad enzimática fueron calculados y expresados en $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

3.5.2.1 Determinación de catalasa

La actividad de CAT se determinó midiendo la disminución en absorbancia resultante del consumo de H_2O_2 usando un coeficiente de extinción molar de $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El cambio en la absorbancia se registró a 240 nm durante 2 min a 37 °C. En larvas de *B. pulchella*, la reacción para medición de la actividad de CAT consistió en incubar en microplacas muestras que contenían 300 μ l de PBS (100 mM, pH 7), 10 μ l de H_2O_2 (dilución de 500 μ l H_2O_2 en 10 ml de agua) y 10 μ l de muestra (sobrenadante de 10000 x g). En *L. latinasus*, la reacción consistió en incubar 300 μ l de PBS, 10 μ l de H_2O_2 y 100 μ l de muestra (sobrenadante de 10000 x g).

Finalmente, para adultos de ambas especies, la reacción para evaluar la actividad de CAT consistió en incubar 300 μ l de PBS, 10 μ l de H_2O_2 y 10 μ l de muestra previamente diluida 1/25 (40 μ l de sobrenadante de 10000 x g en 960 μ l de PBS).

3.5.2.2 Determinación de glutatión-S-transferasa

La actividad de GST se determinó utilizando 1-chloro-2, 4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato con un coeficiente de extinción molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El cambio en la absorbancia se registró a 340 nm durante 2 min a 37 °C. En larvas de ambas especies, la reacción para medición de la actividad de GST consistió en incubar 300 μ l de GST (3 mg de GSH en 10 ml de PBS 100mM, pH 7), 10 μ l de CDBN (0,1 M) y 10 μ l de muestra (sobrenadante de 10000 x g).

Para el caso de los adultos, la reacción consistió en utilizar 300 μ l de GSH (3 mg de GSH en 10 mL de PBS 100mM, pH 7), 10 μ l de CDBN (0,1 M) y 10 μ l de muestra previamente diluida 1/25 (40 μ l de homogenato en 960 μ l de PBS) para ambas especies.

3.5.2.3 Determinación de acetilcolinesterasa

La actividad de AChE fue determinada siguiendo el método de Ellman (1961) utilizando un coeficiente de extinción molar de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El cambio en la absorbancia se registró a 412 nm durante 3 min a 37 °C. En larvas de *B. pulchella*, la reacción para medición de la actividad de AChE consistió en utilizar 200 µl de PBS (100 mM, pH 8), 10 µl de acetilcolina o ATCh (1 mM), 10 µl de DTNB 0,5 mM (ácido 5,5' ditio-bis-nitro benzoico: 10 mg de DTNB en 10 ml de PBS 100 mM, pH= 8) y 50 µl de muestra (sobrenadante de 10000 x g) mientras que en *L. latinasus* la reacción consistió en incubar 200 µl de PBS (pH 8), 10 µl de ATCh, 10 µl de DTNB y 100 µl de muestra (sobrenadante de 10000 x g).

Finalmente, en adultos de ambas especies, la reacción de incubación en microplaca consistió en colocar 200 µl de PBS (pH 8), 10 µl de ATCh, 10 µl de DTNB y 100 µl de muestra previamente diluida 1/5 (200 µl de homogenato en 800 µl de PBS, pH= 8).

3.5.3 Nivel histológico: implementación como novedosos biomarcadores

3.5.3.1 Procesamiento histológico de las muestras de hígado

- *Preparación de las muestras:* Para el procesamiento histológico del hígado, luego de las exposiciones agudas a IMZT, se extrajo el órgano completo de cada larva y un tercio del mismo de cada rana adulta y posteriormente dichas muestras de hígado fueron colocadas solución fijadora Karnovsky (0,1 M buffer fosfato Sörensen, pH 7.2 con 5 % para-formaldehído y 2,5 % de glutaraldehído) por 24 h a 4 °C para posterior procesamiento.

- *Proceso de deshidratación alcohólica e inclusión en resina:* Luego de la fijación, cada muestra de hígado fue lavada con agua destilada, deshidratada en series alcohólicas (las muestras fueron colocadas durante 10 min en 3 fases consecutivas de etanol 100%, 90% y 80%) e incluida en historesina Leica® (0,7 ml acelerador de historesina y 10 ml de GMA o glicol-metacrilato).

- *Cortes histológicos:* Una vez incluida cada porción de hígado, se realizaron cortes histológicos utilizando un micrótopo Leica RM 2265 obteniendo secciones aleatorias de 2 µm de espesor cada 12 µm (~ 65 secciones de cada muestra de hígado), las cuáles fueron colocadas en portaobjetos individuales debidamente rotulados. Específicamente, se montaron 20 secciones de hígado en cada portaobjeto, totalizando tres preparados histológicos por individuo tratado para la descripción morfológica de las patologías hepáticas y la cuantificación de los pigmentos en los melanomacrófagos (MMC).

3.5.3.2 Detección y cuantificación de la pigmentación en melanomacrófagos hepáticos (MMC)

Todos los preparados que contenían las secciones de hígado se colorearon con hematoxilina-eosina (HE) (Figura 16). Para analizar histopatologías y cuantificar la cantidad de melanina contenida en los MMC hepáticos de larvas y ranas adultas se utilizó el primer preparado histológico con secciones de hígado coloreados con HE. Por otra parte, los dos preparados restantes previamente coloreados con HE fueron utilizados para la tinción con técnicas histoquímicas con el objetivo de determinar la presencia de pigmentos catabólicos como lipofuscina y hemosiderina en los MMC hepáticos de adultos.

- *Coloración de los cortes histológicos para detección de melanina en MMC hepáticos:* Brevemente, el procedimiento de coloración con HE consistió en colocar cada preparado en soportes para portaobjetos y sumergirlos en agua destilada durante 1 min. Luego, se retira el excedente de agua destilada y se coloca en solución de hematoxilina de Harris (100%) durante 5 min, y transcurrido ese tiempo se enjuagan en agua de red durante 8 min. Finalizado el enjuague, los preparados en los soportes se colocan en colorante eosina alcohólica (100%) por 3 min y son llevados a una nueva serie de 1 min de deshidratación alcohólica (90% y 100%). Una vez que se deshidrataron los preparados, fueron colocados en vasos coplins que contenían xilol (100%) durante 1 minuto y este procedimiento debió repetirse durante 3 veces. Por último, los preparados fueron retirados de la solución de xilol para realizar el montaje con bálsamo de Canadá colocando 1 gota del mismo sobre un cubreobjetos, el cuál debió ubicarse encima del portaobjetos (que contiene los cortes histológicos recién coloreados) y finalmente se dejaron secar al temperatura ambiente (25 °C) (Figura 16).

- *Coloración de los cortes histológicos para detección de hemosiderina y lipofuscina en MMC hepáticos:* Brevemente, para detectar la lipofuscina, el segundo preparado histológico fue incubado durante 15 min en solución de Schmorl, solución que contiene 75 ml FeCl_3 al 1%, 10 ml de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ y 15 ml de H_2O destilada. Estos preparados luego fueron sumergidos en solución acuosa al 1% de rojo neutro seguida de 1% de eosina.

Por otro lado, para detección de hemosiderina se utilizó el tercer preparado con las secciones histológicas y en este caso cada portaobjeto fue incubado durante 15 min en solución de ferrocianuro ácido (2 g de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en 100 ml de solución de HCl al 5%). Posteriormente, los preparados fueron sumergidos rápidamente en solución acuosa de rojo neutro al 1%. Por último, se colocaron gotas de solución de eosina acuosa al 1% dejando que la misma actúe durante 15 segundos. En ambos casos, sobre los preparados con muestras histológicas coloreadas por histoquímica también se realizó el montaje con bálsamo de Canadá, explicado anteriormente.

- *Cuantificación de la pigmentación en MMC hepáticos:* Luego de cada tinción, todos los preparados histológicos se observaron bajo un microscopio Leica DM4000 B con un sistema de captura de imágenes (Leica DFC 280) para detección de melanina, lipofuscina y hemosiderina.

En el caso de larvas se realizó la cuantificación total de MMC hepáticos por área de hígado mientras que en adultos fue cuantificada el área ocupada por cada pigmento en los MMC hepáticos (melanina, hemosiderina y lipofuscina)

según la metodología descrita por Franco-Belussi y col. (2013). Para detectar cada pigmento en los MMC, se observó la coloración marrón oscura característica de melanina y coloración azulada característica de los pigmentos catabólicos tanto de lipofuscina como de hemosiderina. Para los análisis del área ocupada por los pigmentos, se analizaron 25 micrografías para cada tinción por animal utilizando un sistema de análisis de imágenes automatizado (Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Inc.).

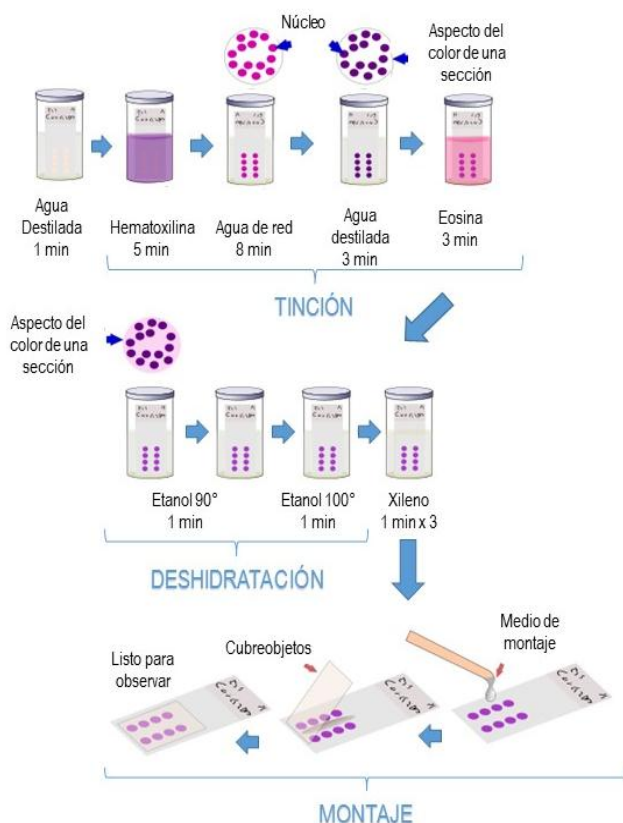


Figura 16. Representación gráfica de la metodología histológica de coloración de Hematoxilina-Eosina para el procesamiento de los hígados en larvas y adultos de las especies estudiadas. Modificado de *Atlas de histología vegetal y animal*, Facultad de Biología, Universidad de Vigo (España) (<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>).

3.5.3.3 Patologías hepáticas

El análisis de las lesiones histológicas en el hígado se realizó sobre diez cortes histológicos mediante la evaluación de diferentes patologías como hipervascularización o congestión (HV), aumento de tamaño en sinusoides hepáticos (AS), vacuolización en hepatocitos (V), hemorragia y necrosis en hepatocitos según la metodología de análisis propuesta para anuros adultos por Çakici (2015). Los análisis se realizaron en fotografías con magnificación 1.000x tomadas con microscopio Leica DM4000 B con un sistema de captura de imágenes (Leica DFC 280).

3.5.4. Nivel individual: efectos letales y subletales

Preparación del material para evaluación de los puntos finales

Luego de transcurridos los tiempos de exposición experimental, los individuos muertos en cada tiempo de exposición fueron registrados en planillas y posteriormente fueron retirados de las cámaras de experimentación para ser fijados en formaldehído al 10% v/v en frascos debidamente rotulados.

Aquellas larvas de ambas especies que permanecían vivas al finalizar cada tiempo de análisis fueron fijadas en solución fijadora Karnovsky (0.1 M buffer fosfato Sörensen; pH 7,2 con 5 % para-formaldehído y 2,5 % glutaraldehído) en frascos debidamente rotulados para la evaluación de los puntos finales subletales individuales tales como crecimiento, desarrollo y presencia de anomalías morfológicas. Por otra parte, los puntos finales letales y subletales individuales de comportamiento fueron registrados diariamente en los organismos vivos durante el tiempo del bioensayo.

3.5.4.1 Puntos finales letales

Este punto final fue evaluado en todos los bioensayos realizados. La mortalidad se registró por observación visual cada 24 h en cada cámara de experimentación. Los individuos se consideraron muertos cuando presentaban aspecto cadavérico bajo lupa y ausencia de movimiento después de un suave toque con una varilla de vidrio (Natale y col. 2006).

3.5.4.2 Puntos finales subletales de condición corporal

a. Evaluación del crecimiento, desarrollo y masa corporal en larvas

El crecimiento larval se evaluó midiendo la longitud corporal hocico cloaca (LHC) de cada larva de acuerdo a McDiarmid y Altig (1999) con un calibre digital de 0,01 mm. La masa corporal se obtuvo mediante la relación del peso húmedo y la longitud corporal. Para obtener el peso húmedo se extrajo cada larva de su correspondiente tratamiento, posteriormente fue colocada en papel secante y finalmente fueron pesadas individualmente en balanza analítica de precisión 0,001 g ubicada. Por otro lado, el estadio de desarrollo se determinó según la clasificación propuesta por Gosner (1960).

b. Evaluación de la condición corporal mediante índices en adultos

Con el objetivo de evaluar el crecimiento y masa corporal en las ranas adultas fueron registrados los siguientes índices: condición corporal (K), hepatosomático (IHS), cuerpos grasos (ICG) y gonadosomático (IG). Los índices utilizados como puntos finales fueron evaluados según el método descrito para las mismas especies por Brodeur y col. (2011,

2012). En particular, el cálculo del índice K se realizó con el método propuesto por Schulte-Hostedde y col. (2005) y Brodeur y col. (2011) basado en el análisis de los residuales de la regresión el cuál se calcula como el cociente entre la masa corporal y la longitud hocico-cloaca (medida con un calibre Vernier con dial de 0,01 mm) elevada a la tercera potencia.

Finalmente, el IHS, ICG y IG fueron calculados como el cociente entre el peso del hígado, el peso de los cuerpos grasos y el peso de las gónadas en relación al peso corporal total, respectivamente (Brodeur et al., 2012). Cada órgano o tejido de interés extraído (hígado, cuerpos grasos y gónadas) fue pesado en balanza analítica de precisión Acculab (Sartorius group). Para obtener peso corporal por rana, cada una de éstas fue pesada en balanza Diamond Series A04 de 0,01 g de precisión. Todos los índices fueron calculados para las ranas de los bioensayos expuestas a IMZT como así también para las ranas de cada sitio de muestreo.

3.5.4.3 Puntos finales subletales de comportamiento

a. Larvas

Las alteraciones en el comportamiento o en la actividad natatoria de las larvas fueron evaluadas y registradas cada 24 h por cada réplica de cada tratamiento. Los cambios en la actividad natatoria fueron evaluados luego de agitar suavemente y en forma circular con una varilla de vidrio en las soluciones de ensayo donde se encontraban las larvas. El comportamiento de cada larva fue observando durante 60 segundos y se comparó la actividad natatoria de cada larva respecto del grupo control (cuyo comportamiento fue evaluado de la misma manera). Específicamente, la actividad natatoria fue registrada de acuerdo a las categorías propuestas por Brunelli y col. (2009):

- larvas que presentaban natación regular,
- larvas que presentaban natación errática, con torsiones del cuerpo y convulsiones; y dichas alteraciones son definidas como natación irregular (IS),
- larvas que presentaban completa quietud durante todo el período de observación (60 segundos) luego del estímulo con la varilla de vidrio categoría denominada inmovilidad (IM).

b. Adultos

Las alteraciones en el comportamiento se evaluaron de dos maneras en las ranas expuestas a IMZT en comparación con el grupo control luego de 48 y 96 h del pulso de exposición:

1. *Observando su capacidad de respuesta (salto) y equilibrio frente a un estímulo mecánico*: Para evaluar la capacidad de respuesta y equilibrio cada rana fue colocada en batea de polipropileno (30 l) donde permaneció durante 5 min hasta su acondicionamiento.

Una vez acondicionada, individualmente a cada rana se le provocó un estímulo realizando un leve contacto con varilla plástica en el dorso (a la altura de la cintura pélvica) y se registró el tiempo que tarda en saltar desde una situación de reposo inicial hasta una nueva situación de reposo o equilibrio.

2. *Evaluando la capacidad de natación*: Esta alteración se realizó colocando cada rana individualmente durante 60 segundos en una batea plástica (30 l) que contenía 5 l de agua de bioensayo y se registró cualquier posible alteración en la natación respecto del control negativo durante ese tiempo.

3.5.4.4 Puntos finales subletales de anomalías morfológicas

a. Larvas

Las anomalías morfológicas se evaluaron en todas las réplicas y para cada larva de manera independiente en los bioensayos agudos para ambos tiempos de exposición, en el bioensayo crónico y en el bioensayo de recuperación. Las anomalías morfológicas en todos los casos fueron registradas utilizando un microscopio binocular estereoscópico Wild Heerbrugg M8. Las anomalías morfológicas en larvas fueron determinadas de acuerdo a las categorías propuestas por Bantle y col. (1998) y además fueron registradas todas las posibles nuevas anomalías morfológicas inducidas por la exposición a IMZT. La prevalencia o frecuencia de cada tipo de anomalía morfológica se calculó como el cociente entre el número de larvas que presenta una anomalía morfológica particular respecto del número total de individuos examinados por tratamiento.

Entre las anomalías morfológicas propuestas por Bantle y col (1998) se evaluaron:

- *La presencia de edema total o parcial en el cuerpo del larva*: esta anomalía se reconoce fácilmente por su forma globosa y transparente debido a que diferentes áreas de la epidermis se encuentran llenas de líquido,
- *Anomalías del eje axial por flexiones en la aleta caudal*: la larva aparece con una flexión leve, moderada o severa (mayor de 45°) en la aleta caudal respecto del eje longitudinal del cuerpo,
- *Pérdida parcial o total de los queratodonte*s: la presencia de esta anomalía morfológica se detectó observando la pérdida parcial o total en las líneas completas de queratodonte o pérdidas individuales de queratodonte en cada línea de queratodonte.

b. Adultos

Luego de los bioensayos con adultos como en los relevamientos a campo de las especies se realizó una prospección general de cada individuo con el objetivo de detectar la presencia de anomalías según las categorías propuestas por Meteyer (2000) y además se registró la presencia de posibles nuevas anomalías en las especies de

estudio considerando reportes previos (Peltzer y col. 2011, Agostini y col. 2013). El análisis de frecuencia y tipo de anormalidades presentes también fue realizado para cada especie tratada con IMZT como también en las poblaciones naturales monitoreadas. Las principales anormalidades morfológicas consideradas para adultos de estas especies pampeanas fueron 8 tipos diferentes definidas como:

- *Amelia*: descrita como aquella anormalidad donde ningún hueso se ha desarrollado más allá de la pelvis y con una desviación leve sobre la cadera (escoliosis),
- *Braquidactilia*: caracterizada por dedos cortos en las extremidades donde el número normal de huesos metatarsianos está presente pero el número de falanges (huesos en el dedo de la pata) están reducidos,
- *Ectrodactilia*: descrita como ausencia de dedos en las extremidades y es distinguido de la braquidactilia debido a que se refiere a un dedo completamente ausente como el hueso metatarsiano y las falanges,
- *Ectromelia*: definida por la presencia de un miembro incompleto con la porción inferior de la extremidad ausente,
- *Hemimelia*: caracterizada por un hueso corto como la tibia pero las extremidades están completas,
- *Microcefalia*: reconocida por ser ranas de cabeza pequeña y hocico corto,
- *Escoliosis*: desvíos en la columna vertebral detectados en el eje longitudinal del cuerpo desde el hocico a la cloaca,
- *Anormalidades en los ojos*: ausencia o lesiones en los ojos.

3.6. Análisis estadísticos

3.6.1 Análisis para el estudio de parámetros ecotoxicológicos según relación concentración-respuesta

Los parámetros ecotoxicológicos de interés y los valores de LC50 en los ensayos agudos se calcularon usando el programa estadístico Probit Analysis versión 1.5 provisto por la USEPA (<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>) basado en el método de Finney (1971). Por otra parte, para analizar la relación concentración-respuesta (C-R) de IMZT respecto a los diferentes puntos finales evaluados a los diferentes tiempos de exposición, se estimaron las curvas de C-R con sus límites de confianza al 95%. Las pruebas de significancia de la regresión y los coeficientes de correlación así como la comparación de las ecuaciones de regresión lineal se realizaron de acuerdo a Zar (2010).

3.6.2 Análisis de la varianza en los puntos finales con un factor dependiente

Para evaluar los efectos adversos producidos por el tratamiento de IMZT respecto del control negativo en todos los puntos finales considerados se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA one-way) con el test Dunnett *a posteriori* que permite obtener los valores de la concentración máxima en la cual no se observan efectos (NOEC) por IMZT y concentración mínima a la cual se observan efectos (LOEC). Particularmente, en las variables discretas tales como los

puntos finales letales (mortalidad) y subletales (comportamiento, anormalidades morfológicas, MNs, BNs, Buds, NLs, y HNs, y frecuencias de células dañadas) se utilizó la proporción de individuos afectados por réplica ($n = 5$). De la misma manera se trataron los datos para evaluar los efectos subletales en adultos y además se añadieron a dichos análisis la proporción de individuos afectados por las diferentes patologías hepáticas (V, HV y ES). Posteriormente, cada proporción fue angularmente transformada utilizando la transformación arco seno [$Y^* = \arcsen \sqrt{Y}$] (Zar, 2010). En algunos casos, en los cuales el objetivo fue evaluar el efecto de dos o más variables independientes sobre los distintos puntos finales considerados, por ejemplo el bioensayo agudo y crónico (concentración y tiempo) y el bioensayo con enzimas de restricción (tratamiento con buffer y enzima aislados o en conjunto, cada tratamiento con exposición y tiempo transcurrido desde la exposición), se realizó un ANOVA multifactorial o MANOVA con test a posterior de Tukey. Los supuestos del ANOVA fueron corroborados con el test de Bartlett para la homogeneidad de las varianzas y la prueba de χ^2 para la normalidad. En aquellos casos donde las variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad, se realizó una prueba de Kruskal- Wallis como por ejemplo en los análisis de comportamiento o de la pigmentación. Finalmente, el análisis para evaluar el crecimiento en el ensayo crónico se realizó mediante un t -test de medidas repetidas (mediciones dependientes) entre el grupo control y los tratamientos con IMZT a cada tiempo de exposición evaluado (Zar, 2010). El nivel de significación elegido fue un $\alpha = 0,05$ para todos los análisis estadísticos utilizados, a menos que se indique lo contrario.

3.6.3 Análisis empleados para realizar comparaciones entre especies estudiadas

Para realizar comparaciones entre dos respuestas diferentes a la misma variable se realizaron las pruebas paramétricas t -test. Específicamente, para evaluar diferencias entre medias se realizaron pruebas de t -test no pareadas como en el caso de las comparaciones de los análisis químicos (análisis entre mediciones a las 0 y 24 h de las concentraciones de IMZT) y en las comparaciones para estimar el OD en el ADN mediante el ensayo cometa modificado (análisis entre los tratamientos con buffer y tratamientos con enzimas de restricción). Por otro lado, se realizaron pruebas de t -test pareado para evaluar la sensibilidad entre especies (comparando el valor LOEC en cada punto final evaluado) y entre estadios de desarrollo de la misma especie (comparando parámetros toxicológicos como los valores LOEC y CL50). Por otra parte, un análisis diferente fue realizado con el objetivo de discutir la sensibilidad relativa de las especies estudiadas y el riesgo asociado a la exposición al IMZT. Para evaluar este objetivo, se realizó un perfil ecotoxicológico del herbicida a partir de los valores de CL50 obtenidos de los bioensayos agudos llevados en otras siete especies de anuros pampeanos. El perfil ecotoxicológico consistió en utilizar todos los valores de CL50_{96h} obtenidos para las larvas de anuros pampeanos en GS25 expuestos a IMZT, para categorizar la sensibilidad de las larvas al herbicida mediante la construcción de una curva de Distribución de Sensibilidad de Especies (SSD) siguiendo el método de la USEPA

(https://www3.epa.gov/caddis/da_advanced_2.html) y Aldenberg y Jaworska (2000). De esta manera, a partir de la SSD, se determinan los parámetros de riesgo denominados Concentración de Riesgo o Hazardous Concentration (HC) y el Riesgo Ecológico Esperado (EER) mediante el uso del software ETX 2.1 y software R v. 2.11.1 (R Core Team 2010). En estos análisis comparativos, el nivel de significación elegido fue un $\alpha = 0,05$ para todos los análisis estadísticos utilizados.

3.6.4 Relación de respuestas evaluadas a diferentes niveles con enfoque multivariado

Para evaluar la correlación de los puntos finales que respondieron (biomarcadores) luego de la exposición a IMZT y poder realizar predicciones sobre la respuesta de cada biomarcador en relación a un gradiente de concentración del herbicida evaluado, se realizó una matriz de correlación, se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson se llevó a cabo un análisis descriptivo de reducción de las dimensionalidades denominado análisis de los componentes principales (PCA). La significancia de las correlaciones se evaluaron empleando las pruebas de hipótesis del t-test ($H_0: \rho = 0$, $H_1: \rho \neq 0$, Ecuación 19.4) previamente explicadas (sección 2.5.3) y siguiendo lo descrito por Zar (2010). A su vez, a partir del PCA se obtuvieron los eigenvalues de cada factor (permiten seleccionar aquellos factores que mejor explican la variabilidad de los datos) y los valores de coordenadas de cada factor o componente. A partir de los valores de coordenadas de cada factor, que agrupa o reduce en un componente todos los biomarcadores, fue posible realizar ANOVA de una vía y test de Dunnett; para evaluar las diferencias significativas del control negativo respecto del gradiente de concentraciones subletales de IMZT explicado por la respuesta de los biomarcadores en su conjunto.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

“RESPUESTA DE LOS DIFERENTES BIOMARCADORES A IMAZETAPIR EN LARVAS Y ADULTOS DE ANUROS PAMPEANOS”

4.1. Aportes a la biología de las especies estudiadas para ser implementadas como modelo de estudio

4.1.1. Resultados de muestreos en campo en *Boana pulchella*

Luego de los 5 años de monitoreo en cada sitio de muestreo, fue posible determinar diferentes parámetros poblacionales de la especie en función de las variables abióticas (temperatura y precipitación acumulada) sobre 313 ejemplares colectados a campo. Los parámetros poblacionales determinados fueron la abundancia relativa por sitio, índice morfométricos de adultos para épocas pre y post reproductivas, número de desovas por época del año y frecuencia de anormalidades, especialmente durante la época reproductiva, previamente detectada por muestreos auditivos. Se determinó que el aumento en la abundancia relativa de *Boana pulchella* en los sitios de estudio está asociado a eventos posteriores de la precipitación intensa en los sitios reproductivos en épocas de bajas temperaturas; es decir, los individuos de *B. pulchella* comienzan su actividad reproductiva una vez que han ocurrido intensas precipitaciones en los sitios que habitan; coincidiendo con el llenado en charcas temporales o el aumento en el nivel de agua en las lagunas permanentes donde las ranas se reproducen en los meses que se registran las temperaturas más bajas del año (marzo – agosto), por lo que hay un desfase entre precipitación acumulada y abundancia relativa (Figura 17). En este contexto, se identificaron un promedio de 10 desovas, en cada sitio, entre marzo y agosto, aunque no hubo desovas durante mayo y junio en los años monitoreados (Figura 17). La presencia de larvas se detectó durante todos los meses del año en diferentes estadios de desarrollo, siendo los meses cercanos a la estación primaveral (entre agosto-octubre) aquellos en los cuáles las larvas presentaban mayor tamaño y estadio de desarrollo. De los resultados obtenidos se constató que los machos no presentan variación en sus índices morfométricos al comparar antes y después de un evento reproductivo ($p > 0.05$). En hembras, la situación fue claramente diferente detectándose diferencias significativas en el índice K ($p < 0,05$) luego de un evento reproductivo (Tabla 1). Por otro lado, se detectaron edemas en la región oral y pérdida del ojo izquierdo en machos y reducción en el número de dedos del miembro posterior derecho (ectrodactilia) en hembras, en frecuencias de aparición menores al 2% y 1%, en machos y hembras, respectivamente. Por último, se colectaron y trasladaron al laboratorio 10 ranas para su posterior procesamiento y con el objetivo de estimar los parámetros normales respecto de las variables morfométricas internas y los puntos finales histológicos, bioquímicos y citológicos de *B. pulchella*; dichos parámetros están expresados en la Tabla 1. Cabe destacar que los valores de los puntos finales histológicos, bioquímicos y citogenéticos presentados en dicha tabla se obtuvieron sólo para machos de ambas especies ya que fueron los individuos colectados en mayor cantidad en campo y en laboratorio lo cual justificaba el número estadístico que permitía obtener tener un valor confiable. Además, permitieron ser utilizados como valores de referencia para los bioensayos con adultos llevados a cabo en individuos machos, con el fin de realizar futuras comparaciones.

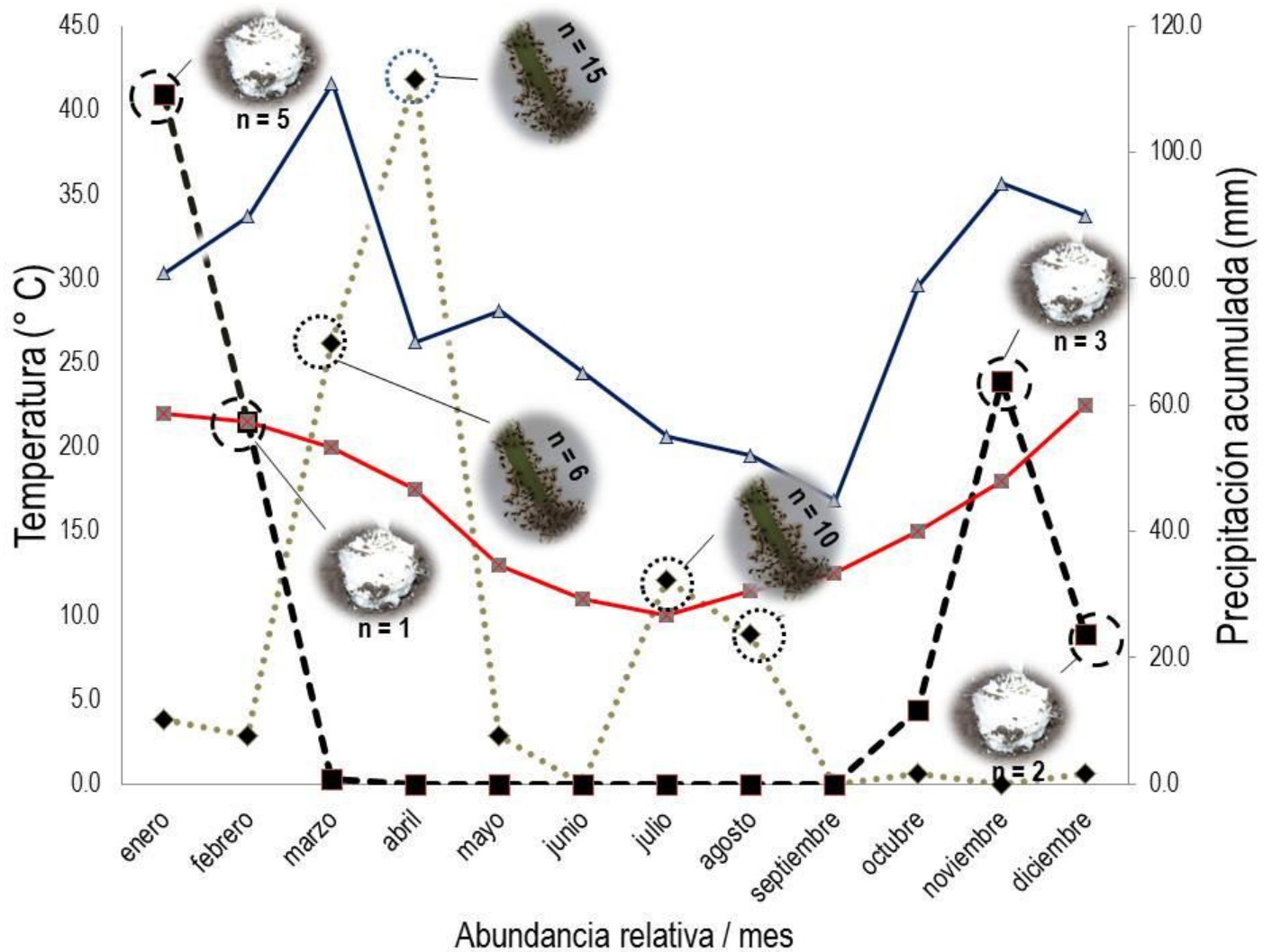


Figura 17. Abundancia relativa por mes de *B. pulchella* (línea punteada) y *L. latinasus* (línea discontinua) estimada en individuos colectados a campo en función de las condiciones abióticas para la región pampeana en La Plata. Las variables abióticas de precipitación (línea azul) y temperatura (línea roja) corresponden al periodo comprendido entre los años 2013-2017, momento en el que se realizaron los monitoreos de las especies. La figura también permite visualizar los meses en que se reproducen y el número de desovas recolectadas por sitio muestreado para cada especie.

Tabla 1. Parámetros poblacionales estimados en adultos de ambas especies estudiadas pertenecientes a sitios de la región pampeana del Gran La Plata

Puntos finales individuales		<i>Boana pulchella</i>		<i>Leptodactylus latinasus</i>	
		machos	hembras	machos	hembras
Índice K	Pre- reproductivo	0,054(±0,013)	0,068(±0,019)	0,071(±0,006)	0,078(±0,009)
	Post- reproductivo	0,058(±0,013)	0,057(±0,015)*	0,065(±0,009)	0,069(±0,007)
Índice hepatosomático		0,019(±0,005)	0,020(±0,004)	0,023(±0,005)	0,033(±0,007)
Índice gonadosomático		0,003(±0,001)	0,043(±0,009)	0,005(±0,002)	0,116(±0,040)
Frecuencia total de anormalidades		0,018	0,009	0,027	0,036
Puntos finales histológicos		Machos		Machos	
Melanina en MMC hepáticos (por área)		<i>En análisis</i> ¹		2412,48(±802,5)	
Puntos finales bioquímicos					
Actividad de CAT (mmol/min/mg Prt)		0,019 (± 0,007)		0,040 (± 0,027)	
Actividad de GST (µmol/min/mg Prt)		0,015 (± 0,007)		0,027 (± 0,019)	
Actividad de AChE (µmol/min/mg Prt)		0,846 (± 0,1760)		4,080 (± 3,510)	
Puntos finales citogenéticos					
Frecuencia de MNs		1,482 (± 1,264)		1,566(±1,374)	
Índice de daño genético		1,150 (± 0,149)		ND	

Se representa el promedio de valores y el desvío estándar de cada parámetro (± DS). ND: no fue posible determinar. ¹Los datos de melanina en adultos de *B. pulchella* están siendo analizados

4.1.2. Resultados de cría en laboratorio en *Boana pulchella*

La cría en cautiverio de las larvas de *B. pulchella* a densidad controlada de 10 individuos por litro, alimentados y con renovación periódica del medio cada 48 h, permitió observar una supervivencia del $93,67 \pm 3,51$ % de las larvas en las tres réplicas utilizadas, desde el GS0 hasta GS42 (metamorfosis). Por otro lado, los estudios sobre el crecimiento y desarrollo durante la cría en cautiverio permitieron estimar las curvas de crecimiento y desarrollo para la especie en condiciones controladas de laboratorio (Figura 18). Específicamente, se pudo observar que el tiempo total de desarrollo desde la fase de huevos (GS0) hasta alcanzar completamente la metamorfosis, con reabsorción total de la aleta caudal (GS44), fue de 62 ± 6 días en las condiciones de laboratorio mencionadas en la sección 3.2.1.2. Además, los resultados permitieron estimar la LHC para cada estadio de desarrollo larval siendo de $0,035 \pm 0,002$ gr y $0,051 \pm 0,006$ en GS25, primera y segunda semana de crianza, respectivamente; $0,068 \pm 0,009$ gr en GS27 (26-28); $0,102 \pm 0,019$ gr en GS32 (30-34); $0,133 \pm 0,024$ gr en GS38 (37-39) y $0,183 \pm 0,018$ gr en GS42 (41-43) (Figura 18). Los análisis de regresión corroboraron que durante desarrollo larval de *Boana pulchella* la longitud hocico-cloaca aumenta significativamente conforme aumenta el tiempo y las larvas avanzan en el estadio de desarrollo ($r = 0,97$; $p < 0,0001$).

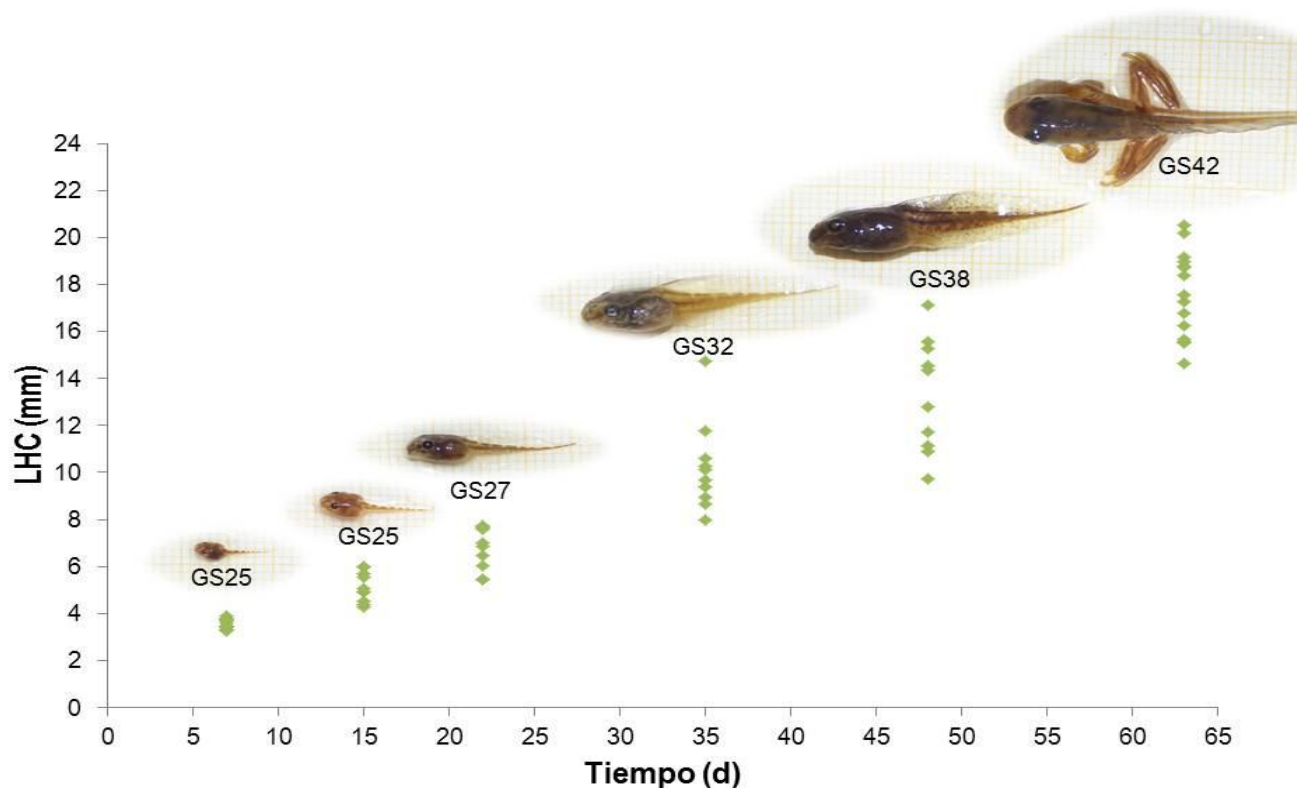


Figura 18. Crecimiento en *B. pulchella* en condiciones controladas de laboratorio. La figura representa el incremento de la longitud hocico-cloaca en función del tiempo para los estadios de desarrollo larval, desde el GS25 hasta la metamorfosis.

En el caso de los adultos, las evaluaciones sobre el progreso y bienestar en función del índice K de las ranas en el bioterio mostraron una mejoría, por aumento del índice K, respecto de los valores de ranas capturadas en campo (momento inicial de cría en cautiverio) y estos resultados permitieron avalar la metodología utilizada para la crianza de *B. pulchella* durante los tres años de cría y mantenimiento en laboratorio. El aumento en el índice K se evidenció significativamente a partir de los 9 meses de acondicionamiento en laboratorio ($p < 0,001$; Figura 19). No obstante, a pesar del bienestar de las ranas en condiciones controladas de laboratorio, no fue posible lograr la reproducción en cautiverio de forma artificial.

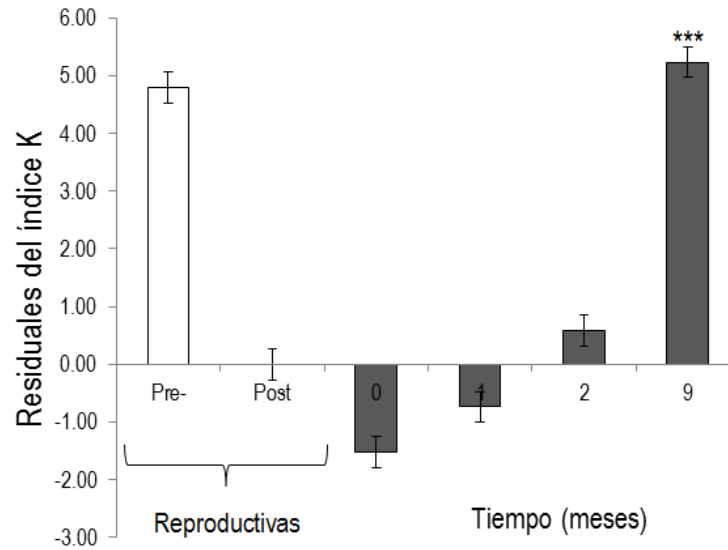


Figura 19. Progresión del índice de condición corporal calculado utilizando el método de residuales en adultos de *B. pulchella* mantenidos en cautiverio durante un año (barras grises) en comparación con individuos tomados de campo en condición corporal pre- y post- reproductiva (barras blancas). 0: corresponde al instante en que fueron colocados por primera vez para cría en cautiverio; 1, 2 y 9: corresponden a los meses transcurridos desde que fueron colocados por primera vez en las jaulas para la cría en cautiverio.

4.1.3. Resultados de muestreos a campo de *Leptodactylus latinasus*

Luego de los 5 años de monitoreo en cada sitio de muestreo fue posible determinar diferentes parámetros poblacionales de la especie en función de dos variables abióticas (temperatura y precipitación acumulada) sobre 222 ejemplares colectados a campo. Cabe destacar que el incremento en la presencia de *L. latinasus* en los sitios de estudio se vio correlacionada positivamente con la variable abiótica temperatura ($r = 0,607$; $p = 0,03$). Se identificaron, en cuevas con un tamaño de $3,73 \pm 1,21$ cm (profundidad) y $5,90 \pm 2,18$ cm (diámetro), un promedio de 3 desovas en cada sitio por mes colocados durante la época de verano, correspondiente a los meses entre noviembre y febrero (Figura 17). A su vez, las larvas de la especie se detectaron sólo durante la estación de verano (diciembre a marzo) y solapándose en el mismo sitio hasta dos generaciones de larvas provenientes de distintos eventos reproductivos ocurridos con diferencia de 13 ± 1 d ($n = 5$). Esta situación fue evidente durante los muestreos al realizar la colecta de larvas GS25 coexistiendo con larvas GS39 a principios de enero e inclusive larvas coexistiendo de GS36 y GS41 a finales de enero en un mismo sitio de colecta el mismo día. Además, de los resultados obtenidos se constató que en machos no hay variación del índice K al comparar antes y después de un evento reproductivo ($p > 0,05$), mientras que en hembras se detectaron diferencias significativas con disminución del índice K, luego de un evento reproductivo ($p < 0,05$) (Tabla 1). Por otro lado, tanto en miembros anteriores como posteriores, se detectó ectromelia y braquidactilia en machos, ectrodactilia y braquidactilia en hembras y

ectromelia, ectrodactilia y braquidactilia en juveniles, en frecuencias menores al 3% machos y juveniles y menores al 4% en hembras (Tabla 1). Por último, de igual forma que en *B. pulchella*, se colectaron y trasladaron al laboratorio 10 ranas para su posterior procesamiento y con el objetivo de estimar la distribución normal de los parámetros de interés como son las variables morfométricas internas y los puntos finales histológicos, bioquímicos y citológicos (Tabla 1).

4.1.4. Resultados de cría en laboratorio de *Leptodactylus latinasus*

La cría en cautiverio de las larvas de *L. latinasus* a densidad controlada de 10 individuos por litro, alimentados y con renovación periódica del medio cada 48 h, permitió observar una supervivencia del $95,71 \pm 5,08$ % de las larvas en las tres réplicas utilizadas, desde el GS0 hasta GS42 (metamorfosis). Por otro lado, los estudios sobre el crecimiento y desarrollo durante la cría en cautiverio permitieron estimar las curvas de crecimiento y desarrollo para la especie en condiciones controladas de laboratorio (Figura 20). Específicamente, se pudo observar que el tiempo total de desarrollo desde la fase de huevos (GS0) hasta alcanzar completamente la metamorfosis, con reabsorción total de la aleta caudal (GS44), fue de 27 ± 3 días en las condiciones de laboratorio mencionadas en la sección 2.2.1.2. Además, los resultados permitieron estimar la LHC para cada estadio de desarrollo larval siendo de $0,0055 \pm 0,0003$ g en GS25 (25-27); $0,011 \pm 0,0014$ g en GS27 (26-28); $0,0124 \pm 0,0016$ g en GS34 (33-37); $0,0277 \pm 0,002$ g en GS40 (38-41) y $0,0317 \pm 0,003$ g en GS45 (44-46) (Figura 20). Los análisis de regresión corroboraron que durante desarrollo larval de *L. latinasus* la LHC aumenta significativamente conforme aumenta el tiempo y las larvas avanzan en el estadio de desarrollo ($r= 0,85$; $p < 0,0001$).

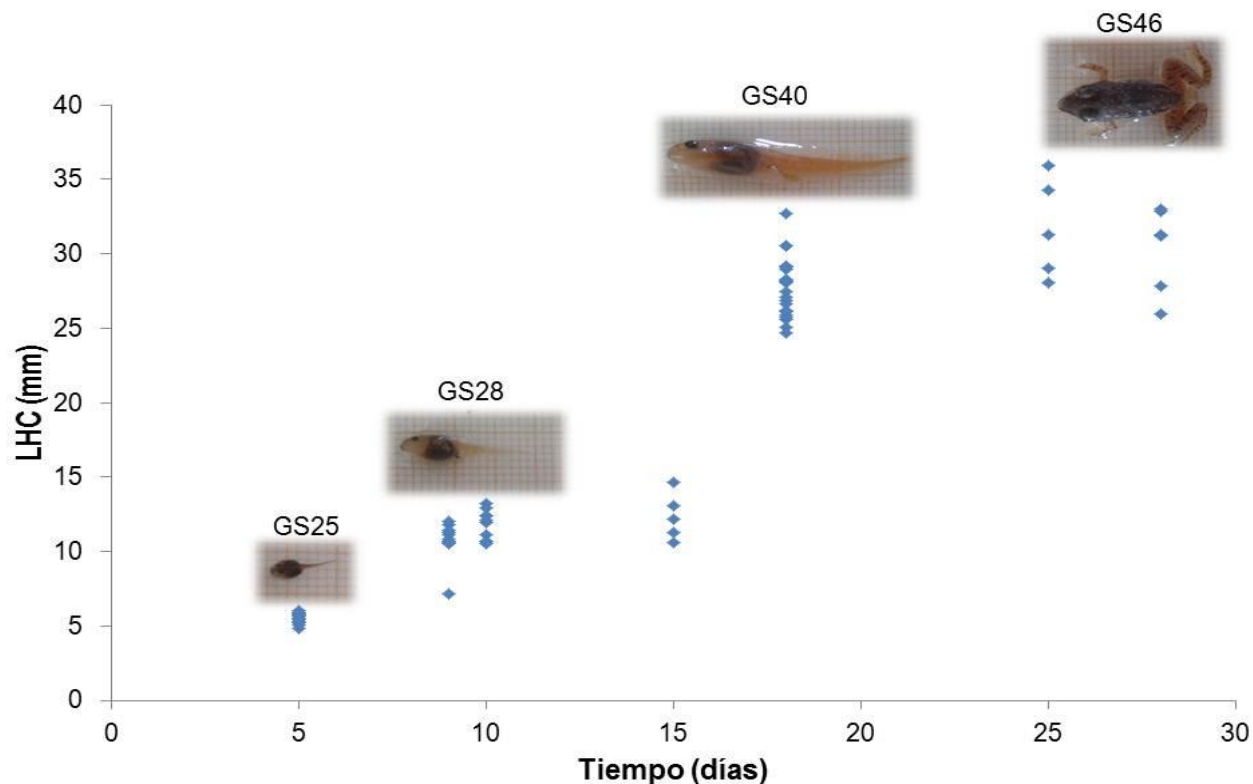


Figura 20. Crecimiento de *L. latinasus* en condiciones controladas de laboratorio. La figura representa el incremento de la longitud hocico-cloaca en función del tiempo para los estadios de desarrollo larval, desde el GS25 hasta la metamorfosis.

En el caso de los adultos, las evaluaciones sobre el progreso y bienestar en función del índice K de las ranas en el bioterio mostraron una mejoría, por aumento del índice K, respecto de los valores de ranas capturadas en campo (momento inicial de cría en cautiverio). El aumento en el índice K se evidenció significativamente a partir de la segunda semana de acondicionamiento en laboratorio ($p < 0,05$) (Figura 21). No obstante, a pesar del bienestar de las ranas en condiciones controladas de laboratorio, no fue posible lograr la reproducción en cautiverio de modo artificial.

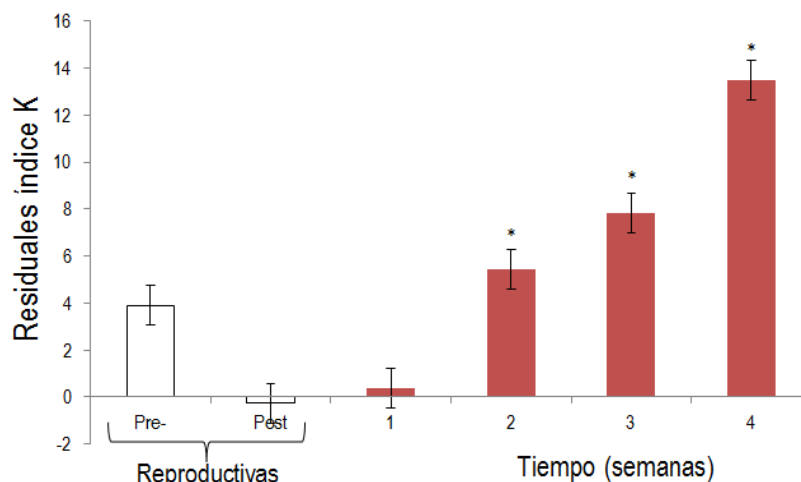


Figura 21. Progresión del índice de condición corporal calculado utilizando el método de residuales en adultos de *L. latinasus* mantenidos en cautiverio (barras grises) en comparación con individuos tomados de campo en condición corporal pre- y post- reproductiva (barras blancas). 0: corresponde al instante en que fueron colocados por primera vez para cría en cautiverio; 1, 2 y 3: corresponden a las semanas transcurridas desde que fueron colocados por primera vez en las jaulas para la cría en cautiverio.

4.2. Análisis de IMZT en bioensayos de toxicidad

Luego de los análisis químicos para evaluar la presencia de IMZT en los tratamientos ($98 \pm 5\%$ recuperación), cuando se realizaron los análisis estadísticos correspondientes, los resultados no mostraron diferencias significativas para antes (0 h) y después de una renovación diaria (24 h) ($p < 0,05$). Los valores de las concentraciones evaluadas fueron $0,407 \pm 0,20$ (0 h) y $0,388 \pm 0,01$ (24 h) correspondientes a la concentración 0,390 mg/l de IMZT; $1,073 \pm 0,07$ (0 h) y $1,049 \pm 0,06$ (24 h) correspondientes a la concentración 1,086 mg/l de IMZT; $1,228 \pm 0,01$ (0 h) y $1,163 \pm 0,20$ (24 h) correspondientes a la concentración 1,170 mg/l de IMZT y $1,434 \pm 0,06$ (0 h) y $1,426 \pm 0,04$ (24 h) correspondientes a la concentración 1,49 mg/l de IMZT.

4.3. Efectos letales y subletales de IMZT en larvas y adultos de *Boana pulchella*

4.3.1 Efectos letales en larvas de *Boana pulchella*

El análisis de la mortalidad reveló un incremento dependiente de la concentración luego de la exposición a IMZT en larvas de *B. pulchella* en GS25 ($r = 0,89$; $p < 0,0001$) y GS36 ($r = 0,75$; $p < 0,01$). Por otro lado, los datos obtenidos a partir de los bioensayos permitieron determinar por el método Probit los valores de CL50 para IMZT luego de 24, 48, 72, y 96 h de exposición, en ambos estadios de desarrollo. Estos resultados revelaron que no hubo variación significativa en los valores de CL50 conforme aumenta el tiempo de exposición ($p > 0,05$). Específicamente, cuando las larvas en GS25 fueron

expuestas a IMZT en ensayo de toxicidad aguda, los resultados mostraron un valor de CL50 (24, 48, 72, 96 h) = 1,48 mg/l de IMZT (límites de confianza 95%; 1,08 – 1,62 mg/l de IMZT) mientras que los valores de CL1 y CL10 resultaron equivalente a 1,02 (0,70 – 1,20) y 1,30 (1,05 – 1,45) mg/l de IMZT, respectivamente. En tanto, los valores NOEC y LOEC fueron 1,22 y 1,36 mg/l de IMZT, respectivamente. En el caso de las larvas en GS36, el valor de CL50 para todos los tiempos fue 1,55 mg/l de IMZT (límites de confianza 95%; 1,51 – 1,60 mg/l de IMZT) mientras que los valores de CL1 y CL10 resultaron equivalente a 1,35 (1,20 – 1,41) y 1,44 (1,35 – 1,48) mg/l de IMZT, respectivamente. En este caso, para el GS36, los valores NOEC y LOEC fueron 1,36 y 1,49 mg/l de IMZT, respectivamente. Además, los resultados obtenidos revelaron que no hubo diferencias significativas en los valores de CL50 al comparar ambos estadios evaluados ($p > 0,05$) y de la misma manera, no se observaron diferencias significativas entre los valores de LOEC obtenidos para larvas del GS25 y GS36 ($p > 0,05$).

4.3.2. Efectos a nivel citogenético

4.3.2.1. Efectos agudos

4.3.2.1.1 MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos

Larvas

En la tabla 2 se expresan los resultados de los MNs y las anormalidades nucleares inducidas por IMZT en los eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella*. Específicamente, se observó un incremento en la frecuencia de MNs para larvas expuestas a CP luego de las 96 h de exposición ($p < 0,001$) pero no en los tratamientos de 48 h ($p > 0,05$). Por otro lado, en larvas expuestas a 1,17 mg/l de IMZT se observó un aumento significativo en la frecuencia de MNs luego de 48 h comparados con el control negativo ($p < 0,05$) mientras que no hubo incremento en la frecuencia de MNs en las menores concentraciones subletales evaluadas, 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT ($p > 0,05$) (Tabla 2). Cuando fue analizada la frecuencia de MNs luego de 96 h de exposición a IMZT se detectó un incremento significativo para todas las concentraciones subletales ($p < 0,05$) (Tabla 2) (Figura 22A). El análisis de regresión demostró que a las 96 h el aumento en la frecuencia de MNs es independiente de la concentración de IMZT ($p > 0,05$).

Tabla 2. Frecuencia (%) de MNs y anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella* expuestas al herbicida formulado Pivot® H

Tiempo (h)	Concentración (mg/l)	N° de células analizadas	Micronúcleos	Anomalías nucleares			
				Hendiduras nucleares	Núcleos lobulados	Binucleadas	Buds o gemaciones
48	Control	15192	4,67±0,84	1,24±0,45	0,52 ± 0,18	1,30 ± 0,62	3,96 ± 0,69
	CP ^a	15527	4,75±1,02	3,08±0,93	0,45 ± 0,16	0,77 ± 0,28	4,47 ± 0,80
	0,39	15641	4,36±0,75	3,04±1,26	0,26 ± 0,14	0,57 ± 0,22	3,65 ± 0,52
	0,78	15468	5,34±1,20	1,97±0,58	0,57 ± 0,15	1,03 ± 0,30	3,10 ± 0,83
	1,17	15445	12,78±3,81*	3,48±0,80	0,84 ± 0,24	2,12 ± 0,47	9,30 ± 1,89*
96	Control	16170	4,38±0,83	1,58±0,47	0,64 ± 0,26	1,28 ± 0,40	4,49 ± 0,51
	CP ^a	15259	10,54±1,80***	5,08±2,53	0,74 ± 0,50	0,99 ± 0,28	11,45 ± 2,28**
	0,39	13442	9,22±1,89**	4,51±0,89*	0,78 ± 0,19	1,12 ± 0,34	11,95 ± 2,08**
	0,78	15944	7,02±0,98*	3,27±1,38	0,97 ± 0,46	1,06 ± 0,28	8,96 ± 0,62*
	1,17	16371	7,97±1,53*	1,36±0,46	0,46 ± 0,13	1,54 ± 0,89	10,08 ± 1,77**

Los resultados son expresados como el número de anomalías/1000 células ± ES. ^a, Ciclofosfamida (CP, 40 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

Por otro lado, el análisis de las anomalías nucleares reveló un aumento significativo en la frecuencia de Buds luego de 48 h sólo en aquellas larvas expuestas a 1,17 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) y estas mismas anomalías nucleares se observaron luego de 96 h de exposición a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,01$). Sumado a esto, en larvas del tratamiento a 0,39 mg/l de IMZT fueron observados HN's luego de 96 h ($p < 0,05$) (Figura 22 B-C). Sin embargo, no se evidenciaron alteraciones significativas en la frecuencia de NL's y BN's por el tratamiento con IMZT, respecto a los valores del control negativo ($p > 0,05$) (Tabla 2).

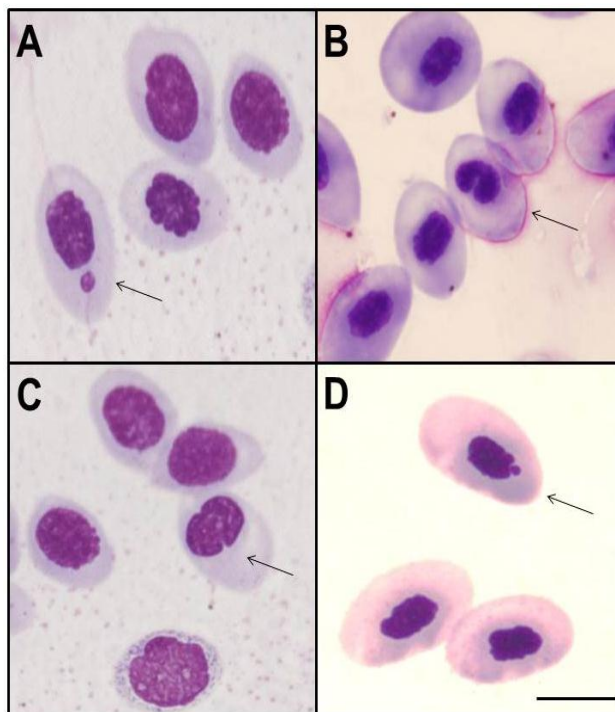


Figura 22. Eritrocitos de sangre periférica con MNs (A) y anomalías nucleares como HNs (B), NLs (C) y gemaciones (D) presentes en larvas de *B. pulchella* por la exposición a Pivot® H. En la figura se indica el eritrocito que presenta la alteración en su núcleo. El tamaño aproximado de un eritrocito en la especie equivale 21 (largo) x 13 (ancho) μm . La barra representa 10 μm .

Adultos

En el caso de los adultos de *B. pulchella*, los resultados del análisis de MNs y anomalías nucleares son presentados en la tabla 3. Estos resultados revelaron que IMZT induce un aumento en la frecuencia de MNs tanto para 48 h como a las 96 h ($p < 0,05$), no obstante el herbicida no induce alteraciones significativas en la frecuencia de anomalías nucleares de los eritrocitos ($p > 0,05$). Particularmente, se observó un incremento en la frecuencia de MNs en las ranas expuestas a CP luego de 48 h ($p < 0,01$) y 96 h de exposición ($p < 0,05$). Por otro lado, en los tratamientos con IMZT se observó un incremento en la frecuencia de MNs en todos los escenarios de exposición considerados luego de 48 h (S1, $p < 0,01$; S2, $p < 0,05$; S3, $p < 0,01$); mientras que se detectó un incremento significativo de MNs en S2 ($p < 0,05$) y S3 ($p < 0,05$) luego de 96 h de la exposición inicial a IMZT.

Tabla 3. Frecuencia (%) de MNs y anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de adultos de *B. pulchella* expuestos al herbicida formulado Pivot® H

Tiempo (h)	Escenario	Concentración (mg/l)	N° células analizadas	Micronúcleos	Anormalidades nucleares			
					Hendiduras Nucleares	Núcleos lobulados	Bi-nucleadas	Buds o gemaciones
48	Control	0	9853	1,48±0,40	0,20±0,13	1,50±0,50	0,20±0,20	6,67±1,41
	S1	10	10348	3,94±0,76**	0,49±0,22	2,06±0,89	0,29±0,29	9,50±2,48
	S2	100	9143	2,74±0,49*	0,32±0,16	2,49±0,85	0,21±0,14	12,82±3,38
	S3	1000	11233	3,27±0,51**	0,99±0,54	2,42±0,43	0,18±0,12	8,13±2,93
	CP ^a	50	10643	4,84±0,63***	1,12±0,40	3,21±1,03	0,09±0,09	10,38±2,44
96	Control	0	10214	1,66±0,33	1,48±0,68	3,73±0,47	0,69±0,21	6,32±2,16
	S1	10	9964	2,26±0,31	1,69±0,80	2,06±0,56	0,30±0,15	4,46±1,46
	S2	100	9239	3,34±0,69*	0,87±0,34	2,72±0,93	0,22±0,14	7,16±2,88
	S3	1000	10280	2,82±0,46*	2,95±1,48	3,19±1,39	0,97±0,55	11,26±3,61
	CP ^a	50	10269	3,22±0,37*	1,36±0,33	3,33±1,05	0,87±0,44	11,22±2,47

Los resultados son expresados como el número de anomalías/1000 células \pm ES. ^a, Ciclofosfamida (CP, 50 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

4.3.2.1.2 Daño en el ADN evaluado por EC

Larvas

Los resultados obtenidos del EC en células sanguíneas circulantes de larvas de *B. pulchella* son presentados en la tabla 4 y la media de las frecuencias de cada categoría de daño representadas en la figura 2 de la publicación 1 (Anexo 1). Los tratamientos con CP revelaron que el control positivo induce un aumento significativo del IDG así como en la frecuencia de células dañadas a las 48 y 96 h de exposición al ser comparadas con los individuos del control negativo ($p < 0,01$) (Tabla 4). En las larvas expuestas a IMZT, hubo un incremento significativo del IDG luego de las 48 h de tratamiento con IMZT para todas las concentraciones ($p < 0,05$) (Tabla 4). En aquellas larvas expuestas por 48 h se observó un incremento en la frecuencia de los nucleoides tipo II para 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) y un aumento de nucleoides tipo III en el intervalo de concentraciones entre 0,39–1,17 mg/l de IMZT ($p_{0,39} < 0,05$ y $p_{1,17} < 0,01$) (Figura 23D) con una disminución consecuente de los nucleoides tipo 0-I ($p < 0,05$) (Figura 23 A-B) para todas las concentraciones evaluadas (Figura 2A, publicación 1). Cuando el análisis fue realizado en larvas expuestas durante 96 h a IMZT, se observó un incremento significativo del IDG para todas las concentraciones observadas ($p < 0,01$) (Tabla 4). Dicho aumento se debió a un aumento significativo de la frecuencia de nucleoides de tipo II ($p < 0,05$) (Figura 23C) en todas las concentraciones evaluadas acompañado por un incremento en la frecuencia de nucleoides de tipo IV (Figura 22E) sólo las larvas tratadas a 1,17 mg/l de IMZT ($p < 0,01$); con una consecuente disminución de los nucleoides de tipo 0-I ($p < 0,01$) (Figura 2B,

publicación 1). El análisis de regresión demostró que el IDG aumenta de forma dependiente con la concentración IMZT en los tratamientos de las 96 h ($r = 0,35$; $p < 0,05$), pero no ocurrió con las larvas tratadas con IMZT a las 48 h ($p > 0,05$).

Tabla 4. Análisis del daño en el ADN medido por el ensayo cometa en larvas de *B. pulchella* expuestas al herbicida IMZT en su formulado Pivot® H

Tratamiento	Concentración (mg/l)	Tiempo (h)	N° de animales analizados	N° de células analizadas	% de células dañadas (II+III+IV)	IDG \pm ES
Control negativo		48	17	1801	30,72	1,04 \pm 0,12
		96	14	1355	27,60	1,09 \pm 0,13
Pivot® H	0,39	48	15	1589	52,75**	1,61 \pm 0,11**
		96	15	1742	51,55**	1,49 \pm 0,11*
	0,78	48	15	1537	47,03*	1,46 \pm 0,15*
		96	15	1595	60,41***	1,61 \pm 0,07**
	1,17	48	16	1582	49,18*	1,50 \pm 0,15*
		96	15	1487	59,93***	1,81 \pm 0,20***
CP ^a	40	48	15	1555	68,41***	2,14 \pm 0,22***
		96	16	1681	59,14**	1,85 \pm 0,21**

^a, Control positivo: Ciclofosfamida (40 mg/l). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; indican diferencias significativas respecto del control negativo.

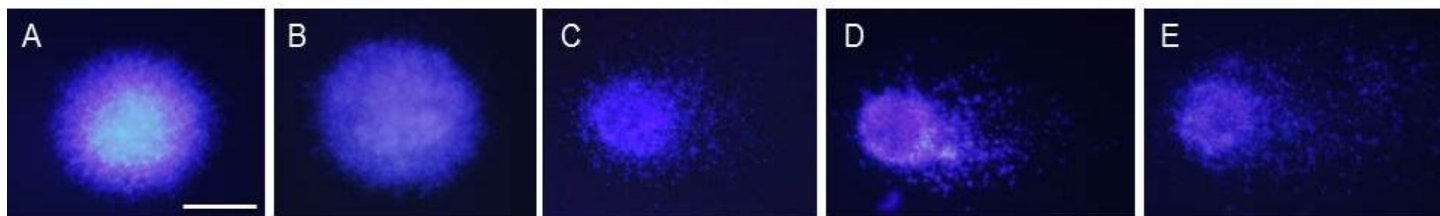


Figura 23. Diferentes tipos de nucleoides observados en larvas de *Boana pulchella* expuestas a IMZT. Nucleoides no dañados: tipo 0 (A) y tipo I (B); nucleoides dañados: tipo II (C), tipo III (D) y tipo IV (E). La barra corresponde a 2 μ m.

Adultos

En el caso de los adultos, expuestos a IMZT en diferentes escenarios los resultados demostraron que hubo un aumento en el daño genético expresado como un aumento en el IDG y en el porcentaje de células dañadas luego de 48 y 96 h del pulso de exposición (Tabla 5, Figura 24). A partir de los resultados se pudo observar que CP produce daño en el ADN detectado por un aumento significativo en frecuencia de categorías de nucleoides III y IV ($p < 0,01$) y II y III ($p < 0,05$), a las 48 y 96 h, respectivamente; lo que determina un aumento en el valor del IDG y la consecuente disminución de los nucleoides tipo I-0 en ambos tiempos de exposición. Por otra parte, al evaluar el daño genético en ranas expuestas a IMZT, se encontró que la exposición experimental induce daño genético a las 48 h por aumento del IDG en todos los escenarios considerados como consecuencia de un aumento en la frecuencia de nucleoides tipo III en S1 ($p < 0,01$) y S3 ($p < 0,05$) y un aumento de la frecuencia de nucleoides tipo II y III en S2 ($p < 0,05$), seguido por una disminución de los nucleoides tipo

0-I en todos los casos ($p < 0,05$). Luego de 96 h del pulso agudo, los análisis revelaron un aumento significativo del daño genético en S3 ($p < 0,001$) pero no para S2 y S1 ($p > 0,05$). Específicamente, el aumento del daño genético expresado en el IDG para las ranas de S3 se produjo por un aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo III ($p < 0,001$).

Tabla 5. Análisis del daño en el ADN medido por el ensayo cometa en adultos de *B. pulchella* expuestos a herbicida IMZT en su formulado Pivot® H

Tiempo de exposición (h)	Escenario	Concentración (mg/l)	N° de ranas analizadas	N° de células analizadas	% de células dañadas (II+III+IV)	IDG \pm ES ^a
48	Control	0	8	862	31,44	1,15 \pm 0,05
	10 mg/l (S1)	10	10	1047	55,14*	1,83 \pm 0,14**
	100 mg/l (S2)	100	10	1017	67,15**	1,82 \pm 0,18**
	1000 mg/l (S3)	1000	8	727	53,86*	1,75 \pm 0,23*
	CP	50	10	1135	55,08*	1,77 \pm 0,09*
96	Control	0	10	1064	24,10	1,03 \pm 0,10
	10 mg/l (S1)	10	8	898	41,87	1,39 \pm 0,23
	100 mg/l (S2)	100	8	866	43,22	1,48 \pm 0,13
	1000 mg/l (S3)	1000	9	992	53,57**	1,60 \pm 0,21**
	CP	50	10	1057	60,25***	1,77 \pm 0,13**

^a, IDG: índice de daño genético. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; indican diferencias significativas respecto del control negativo.

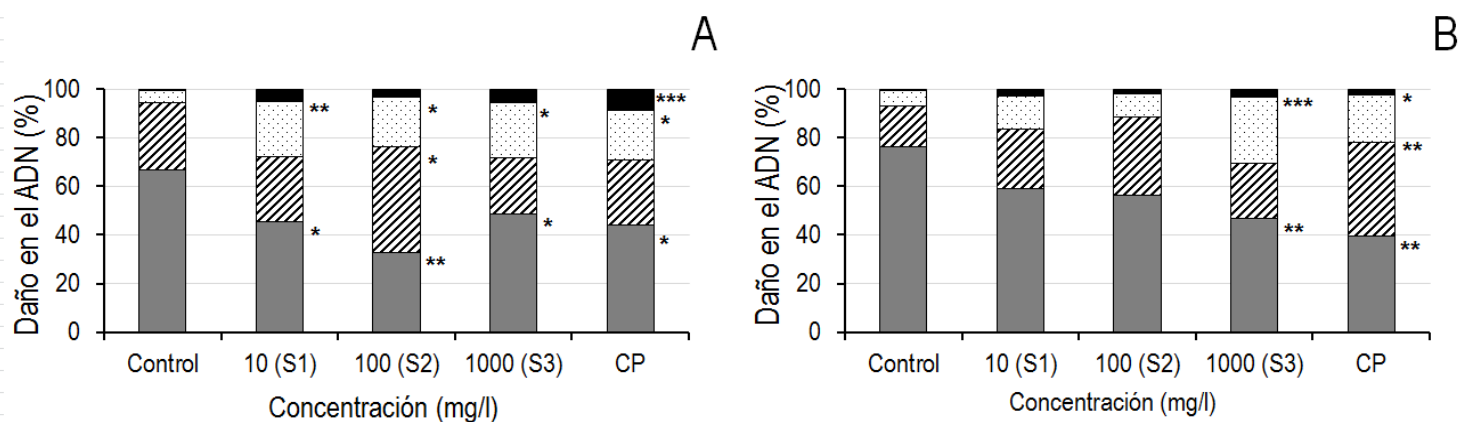


Figura 24. IMZT induce daño en el ADN evaluado mediante el ensayo cometa en células sanguíneas circulantes de adultos de *Boana pulchella* detectado a las 48 (A) y 96 h (B) luego de la exposición por pulso agudo. Los gráficos de barra representan las frecuencias de nucleoides no dañados (tipo 0-I; sección de barra gris) y frecuencias de nucleoides dañados tipo II (secciones con líneas negras en la barra), tipo III (secciones con puntos negros en la barra) y tipo IV (secciones negras en las barras). Los resultados son expresados como el porcentaje promedio de cada categoría de nucleóide por tratamiento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (diferencias significativas respecto de los valores del grupo control).

4.3.2.2 Efectos crónicos en larvas a nivel citogenético

Los resultados demostraron que IMZT a bajas concentraciones en una exposición crónica produce efectos genotóxicos durante el ciclo larval completo de *B. pulchella* (Tabla 6 y 7). Por un lado, se constató que el control positivo con CP induce MNs y daño al ADN ($p < 0,05$) y se constató que induce dicho daño en el ADN comienza a partir del día 28 y perdura hasta el final del ensayo ($p < 0,01$) (Tabla 6 y 7, Figura 25). Por otro lado, se observaron efectos genotóxicos en las larvas expuestas de forma crónica a IMZT, y dichos efectos fueron detectados tanto por el ensayo de MNs como por el EC ($p < 0,05$), a partir del día 28 del ensayo (momento en el cual las larvas alcanzaron el GS36) hasta el día 49, momento en el cuál finalizó el ensayo (los individuos del grupo control alcanzaron el GS42).

Tabla 6. Frecuencia (%) de MNs y anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella* expuestas en ensayo crónico a 0,19 mg/l de IMZT del formulado Pivot® H

Tiempo de exposición (d)	Tratamiento	N° de animales analizados	N° de células analizadas	MNs	Otras anomalías nucleares			
					HNs	NLs	BNs	Buds
28	Control	14	14495	1,93 ± 0,25	0,27 ± 0,12	0,28 ± 0,12	0,50 ± 0,20	2,89 ± 0,45
	Pivot® H	15	15596	2,64 ± 0,27*	0,44 ± 0,15	0,25 ± 0,11	0,32 ± 0,12	2,43 ± 0,57
	CP ^a	15	15790	2,72 ± 0,27*	0,76 ± 0,39	0,64 ± 0,20	0,13 ± 0,09	4,10 ± 0,52
35	Control	15	15584	2,60 ± 0,45	0,25 ± 0,14	1,24 ± 0,33 [#]	0,95 ± 0,26	2,85 ± 0,39
	Pivot® H	14	14627	4,05 ± 0,48*	0,66 ± 0,28	0,97 ± 0,36	1,69 ± 1,06	6,02 ± 0,88**
	CP ^a	14	14442	4,15 ± 0,57*	0,34 ± 0,16	0,35 ± 0,13**	0,28 ± 0,16	2,99 ± 0,47
42	Control	13	13062	2,86 ± 0,28	1,41 ± 0,50	0,22 ± 0,12	0,29 ± 0,13	4,05 ± 0,73
	Pivot® H	13	13360	4,76 ± 0,65*	1,41 ± 0,40	0,96 ± 0,27*	1,46 ± 0,30**	6,22 ± 1,18
	CP ^a	13	13369	4,55 ± 0,44*	1,11 ± 0,32	0,44 ± 0,17	0,45 ± 0,26	3,57 ± 0,55
49	Control	14	14482	2,41 ± 0,46	0,62 ± 0,27	1,24 ± 0,31 [#]	0,62 ± 0,16	4,76 ± 1,50
	Pivot® H	13	13433	4,44 ± 0,97*	0,15 ± 0,10	0,66 ± 0,22	1,25 ± 0,34	2,98 ± 0,58
	CP ^a	14	14329	3,97 ± 0,61*	0,81 ± 0,31	1,18 ± 0,46	0,75 ± 0,30	5,91 ± 1,70

Los resultados son expresados como el número de anomalías/1000 células ± ES. ^a, Ciclofosfamida (CP, 25 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

Tabla 7. Análisis del daño en el ADN medido por el ensayo cometa en larvas de *B. pulchella* expuestos en bioensayos crónico al 0,19 mg/l de IMZT en su formulado Pivot® H

Tiempo (d)	Tratamiento	N° individuos analizados	N° nucleoides analizados	% de daño en nucleoides (II+III+IV)	IDG ± ES
28	Control	14	1447	28,91	1,06 ± 0,08
	Pivot® H	14	1380	39,90*	1,38 ± 0,07**
	CP	14	1370	49,79**	1,68 ± 0,10***
35	Control	14	1405	26,78	1,18 ± 0,08
	Pivot® H	14	1581	42,80**	1,47 ± 0,08*
	CP	15	1533	58,27***	1,69 ± 0,06***
42	Control	15	1575	30,79	1,26 ± 0,06
	Pivot® H	15	1606	52,32***	1,61 ± 0,06***
	CP	15	1575	56,34***	1,64 ± 0,05***
49	Control	14	1492	33,39	1,17 ± 0,07
	Pivot® H	14	1400	53,23***	1,63 ± 0,09***
	CP	14	1676	55,21***	1,62 ± 0,05***

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; indican diferencias significativas respecto del control negativo. CP: Ciclofosfamida, 25 mg/l.

Específicamente, el aumento significativo en el daño del ADN representado en el IDG a lo largo de todo el ensayo crónico se debió a un aumento en las frecuencias de nucleoides dañados de tipo II del día 28 al 42 (Figura 25 A-C) ($p < 0,05$) y de tipo III y IV el día 49 (Figura 25D) ($p < 0,05$), con una consecuente disminución de los nucleoides tipo 0-I ($p < 0,01$).

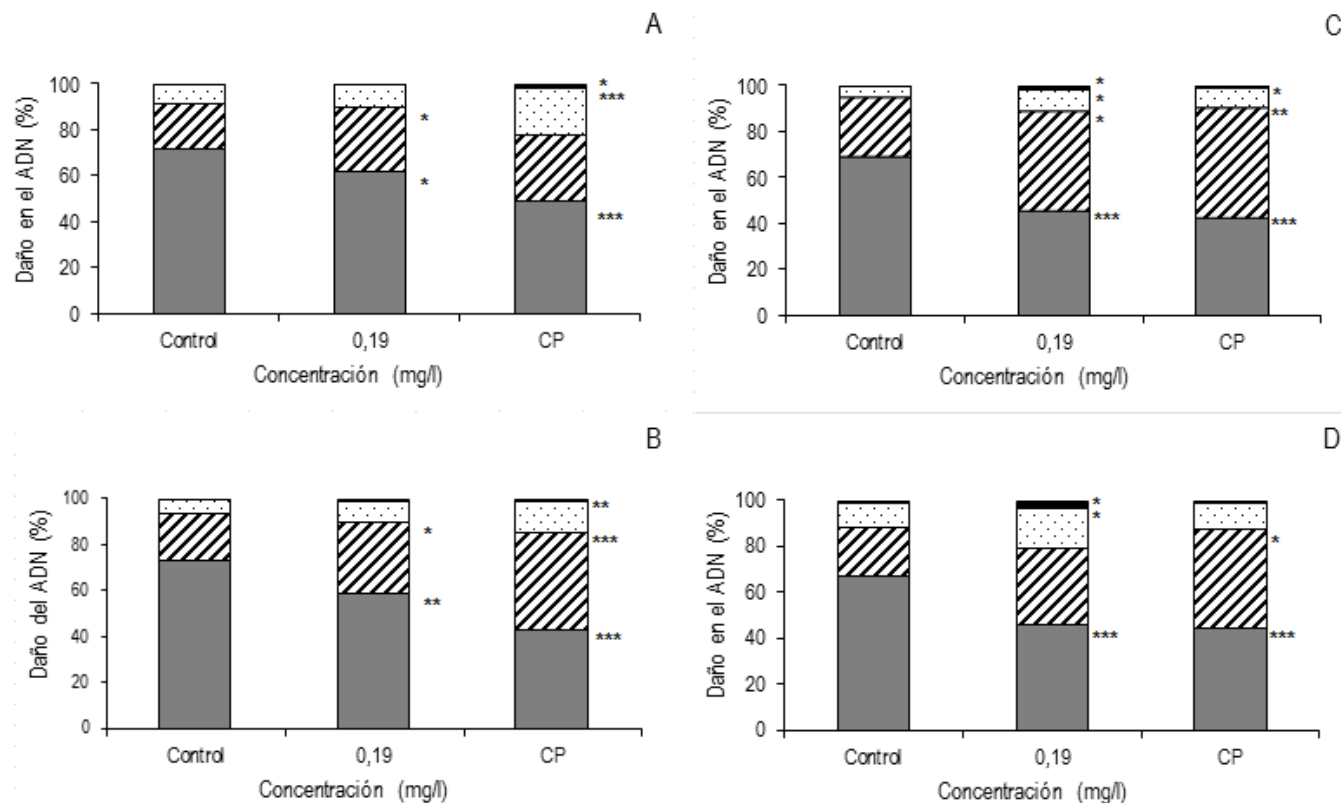


Figura 25. Daño en el ADN inducido por la exposición crónica a 0,19 mg/l de IMZT en células sanguíneas circulantes de larvas de *Boana pulchella* evaluado mediante el ensayo cometa. Los gráficos de barra representan las frecuencias de nucleoides no dañados (tipo 0-I; sección de barra gris) y frecuencias de nucleoides dañados tipo II (secciones con líneas negras en la barra), tipo III (secciones con puntos negros en la barra) y tipo IV (secciones negras en las barras) para cada tiempo de exposición evaluado en el ensayo crónico correspondientes a los 28 (A), 35 (B), 42 (C) y 49 días (D). Los resultados son expresados como el porcentaje promedio de cada categoría de nucleóide por tratamiento. CP: Ciclofosfamida, 25 mg/l. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (diferencias significativas respecto de los valores del grupo control).

4.3.2.3 Evaluación del daño oxidativo producido por IMZT en larvas

a. Exposición *in vivo*

Los resultados del ensayo cometa modificado utilizando enzimas de restricción Endo III y Fpg en células sanguíneas circulantes de larvas de *B. pulchella* (GS36), previamente expuestas *in vivo* en bioensayo agudo a 0,39 mg/l de IMZT durante 48 y 96 h, se presentan en Tabla 8, y los niveles de daño oxidativo neto del ADN están representados en la Figura 26. Por otra parte, el control positivo que consistió en el tratamiento con H_2O_2 fue capaz de inducir un aumento en la frecuencia de las células dañadas respecto del control negativo ($p < 0,001$). Sumado a esto, en aquellas células del control positivo donde se utilizó la incubación con enzimas de restricción, se observó un aumento significativo del daño en el ADN

reflejado en los valores de IDG y DO, tanto en células incubadas con Endo III ($p < 0,01$) como con Fpg ($p < 0,001$), respecto del control positivo sin incubación de enzimas (Tabla 6; Figura 26). En el caso de las larvas expuestas al herbicida Pivot® H, el tratamiento con Fpg produjo un aumento significativo en el daño del ADN en comparación con las células sin tratamiento con la enzima para ambos tiempos de exposición ($p < 0,05$; Tabla 8; Figura 26). Particularmente, las diferencias en el daño del ADN de los nucleoides en las larvas expuestas a Pivot® H con incubación de Fpg se deben a un aumento en los nucleoides de tipo III y IV después de 48 y 96 h, respectivamente ($p < 0,05$; Tabla 8), respecto de aquellos nucleoides que no fueron incubados con la enzima. Por otro lado, la incubación con Endo III de los nucleoides expuestos a Pivot® H no indujo diferencias significativas en el nivel de daño en el ADN y el IDG, respecto de los nucleoides expuestos a Pivot® H que no fueron incubados con Endo III ($p > 0,05$; Tabla 8; Figura 26).

Tabla 8. Análisis del daño en el ADN medido por el ensayo de cometa modificado en células de sangre de *Boana pulchella* expuestas *in vivo* a la formulación comercial del herbicida Pivot® H

Compuesto	Tiempo (h)	Tratamiento	N° de nucleoides analizados	Proporción de nucleoides dañados (%) ^a				IDG \pm ES ^b
				Tipo 0+I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	
Control	48	Negativo	1128	70,90	15,47	12,06	1,57	1,13 \pm 0,13
		Buffer EndoIII	1049	59,10	24,12	15,44	1,34	1,42 \pm 0,18
		EndoIII	927	57,39	35,50###	12,62	1,25	1,49 \pm 0,09#
		Buffer Fpg	959	60,58	23,67	13,24	2,50	1,48 \pm 0,08#
		Fpg	1051	54,81#	25,02#	18,08	2,09	1,55 \pm 0,04##
Pivot® H	48	0,39 mg/l	914	46,61	38,18	14,00	1,20	1,54 \pm 0,12**
		Buffer EndoIII	806	47,52	37,84	13,65	0,99	1,63 \pm 0,05
		Endo III	941	45,17	37,62	16,26	0,95	1,66 \pm 0,08
		Buffer Fpg	988	50,51	30,77	17,41	1,32	1,62 \pm 0,11
		Fpg	983	29,91#&	40,18	27,06#&	2,85	1,98 \pm 0,12#&
Control	96	Negative	972	73,42	17,72	7,38	1,48	1,12 \pm 0,07
		Buffer EndoIII	929	70,49	25,55	7,11	1,33	1,17 \pm 0,08
		EndoIII	995	67,64	26,13#	5,53	0,70	1,19 \pm 0,08
		Buffer Fpg	984	55,89##	31,81##	10,36	1,93	1,49 \pm 0,07##
		Fpg	1006	49,20###	42,44###	12,22	1,88	1,57 \pm 0,10###
Pivot® H	96	0,39 mg/l	1105	50,95	31,95	15,29	1,81	1,56 \pm 0,14**
		Buffer EndoIII	1039	50,79	36,84	10,31	2,06	1,52 \pm 0,08
		Endo III	1102	49,37	33,03	14,25	3,36	1,64 \pm 0,13
		Buffer Fpg	991	42,38	35,12	19,27	3,23	1,78 \pm 0,12
		Fpg	930	30,97#&	36,77	24,52	7,74#&	2,08 \pm 0,08#&
Control Positivo ^c		50 μ M	1000	29,94	38,62	29,61	1,84	2,00 \pm 0,09***
		Buffer EndoIII	1160	29,18	32,29	19,51	9,01	1,93 \pm 0,16
		EndoIII	993	15,11#	29,47#	41,81	13,60#	2,53 \pm 0,14#&&
		Buffer Fpg	1161	35,25	35,46	22,40	6,89	1,99 \pm 0,10
		Fpg	991	12,62##	15,48##	29,35	42,56###	3,05 \pm 0,17###&&&

^a, I-IV indica las categorías del daño en el ADN. ^b, se presentan los resultados como la media del IDG por tratamiento y su respectivo ES. ^c, H₂O₂ (50 μ M), utilizado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; comparaciones de

cada tratamiento respecto de los valores del control negativo. #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$; comparaciones dentro de los tratamientos con su respectivo grupo control. &, $p < 0.05$; && $p < 0.01$; &&&, $p < 0.001$; comparaciones entre la enzima y su respectivo buffer.

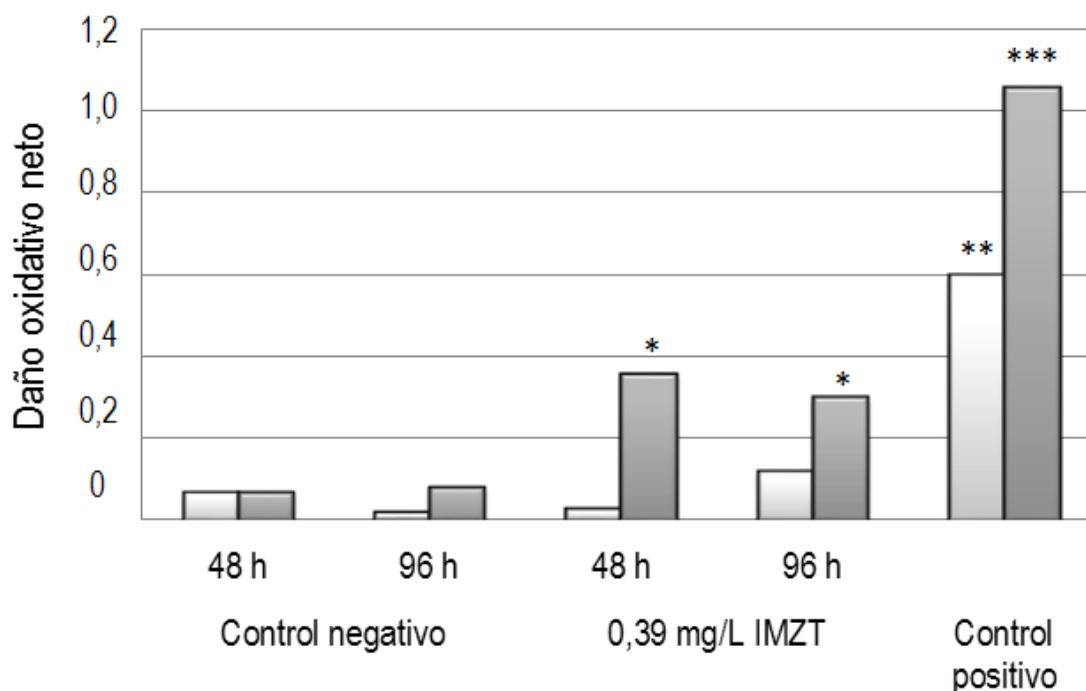


Figura 26. Daño oxidativo en el ADN inducido por la exposición *in vivo* a IMZT en células sanguíneas circulantes de larvas de *Boana pulchella* evaluado mediante el ensayo cometa modificado utilizando EndoIII (barras gris clara) y Fpg (barras gris oscura). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (diferencias significativas respecto de los valores del grupo control).

b. Exposición ex vivo

Sumado a esto, los resultados del ensayo *ex vivo* corroboraron los resultados obtenidos del ensayo *in vivo* previamente descrito. Los valores de IDG y DO obtenidos de la exposición *ex vivo* de células sanguíneas circulantes de *B. pulchella* son expresados en la Tabla 9. Específicamente, los nucleoides previamente expuestos *ex vivo* a Pivot® H que recibieron el tratamiento de incubación con Fpg mostraron un aumento significativo en el daño del ADN, respecto de los nucleoides que no recibieron el tratamiento de incubación con la enzima, cuyo resultado se expresa en el DO ($p < 0,001$). Por otro lado, aquellos nucleoides expuestos con Pivot® H y con incubación de Endo III no mostraron diferencias significativas respecto de aquellos nucleoides tratados *ex vivo* con Pivot® H y sin recibir la incubación de Endo III ($p > 0,05$; Tabla 9). Por otra parte, se corroboró que el control positivo de agua oxigenada produce daño oxidativo en el ADN de larvas de *B. pulchella* ($p < 0,001$). Específicamente, se detectó luego de la incubación con EndoIII y Fpg un aumento

significativo en el daño del ADN, respecto de los nucleoides que no recibieron el tratamiento de incubación con dichas enzimas, este resultado puede observarse claramente en el valor del DO ($p < 0,001$, Tabla 9).

Tabla 9. Análisis del daño en el ADN medido por el ensayo de cometa modificado en células de sangre de *Boana pulchella* expuestas *ex vivo* a la formulación comercial del herbicida Pivot® H

Tratamiento	Tipo de exposición	N° animales analizados	N° de nucleoides analizados	% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG \pm ES	OD
Control negativo	Buffer EndoIII	10	1000	12,30	0,27 \pm 0,08	
		10	1064	62,13***	1,55 \pm 0,14***	-
	EndoIII	10	1076	76,39***#	1,99 \pm 0,18***	0,44
	Buffer FPG	10	972	68,41***	1,61 \pm 0,21***	-
	Fpg	10	1106	83,73***#	2,18 \pm 0,13***	0,57
Pivot® H	0.39 mg/l	10	1037	62,22	1,72 \pm 0,24***	
	Buffer Endo III	10	1275	78,98	1,96 \pm 0,13***	-
	Endo III	10	982	74,94	2,23 \pm 0,16***	0,27
	Buffer FPG	10	830	50,36	1,11 \pm 0,10***	-
	FPG	10	936	90,70***###	3,59 \pm 0,08***###	2,48###
Control positivo ^a	50 μ M	10	1039	82,00	2,29 \pm 0,12***	
	Buffer EndoIII	9	992	71,97	1,63 \pm 0,25***	-
	EndoIII	9	945	89,21#	2,74 \pm 0,13***#	1,11#
	Buffer FPG	10	1088	73,90	1,64 \pm 0,09***	-
	Fpg	10	864	94,91###	3,53 \pm 0,08***###	1,89###

^a H₂O₂ (50 μ M) fue utilizada como control positivo *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; comparado respecto de los valores del control negativo. #, $p < 0,05$; ##, $p < 0,01$; ###, $p < 0,001$; comparación de la enzima con su respectivo buffer.

4.3.2.4 Evaluación de las capacidades de recuperación al daño producido por IMZT en larvas de *Boana pulchella* a nivel citogenético

a. MNs y anomalías nucleares

Los resultados de inducción de MNs y otras anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella* se resumen en la Tabla 10. Al final de la fase de exposición, en las larvas expuestas a CP se observó un aumento significativo de la frecuencia de MNs ($p < 0,01$). Cuando se analizaron las anomalías nucleares por la exposición a CP los resultados revelaron un aumento significativo en la frecuencia de NLs ($p < 0,01$) y Buds ($p < 0,01$). Por otra parte, en larvas tratadas con IMTZ durante la fase de exposición, se observó un aumento significativo en la frecuencia MNs con respecto a los controles negativos ($p < 0,01$) y un aumento significativo en la frecuencia anomalías nucleares tales como HNAs ($p < 0,05$) y Buds ($p < 0,01$) respecto a los valores del grupo control (Tabla 10).

Durante la fase post-exposición, las larvas expuestas al CP mostraron un aumento significativo en la frecuencia de MNs luego del día 11 ($p < 0,001$) aunque para los días 18 y 25 no se detectaron diferencias significativas respecto del control negativo ($p > 0,05$). En el caso de las anomalías nucleares, en larvas previamente expuestas a CP, no se

observaron diferencias significativas respecto de los controles negativos para todos los días evaluados durante la fase de post-exposición ($p > 0,05$). Por otro lado, los resultados demostraron que las larvas de la fase de post-exposición previamente tratados con IMZT no mostraron diferencias significativas ni en la frecuencia de MNs ni en las anormalidades nucleares con respecto del control negativo para todos los tiempos evaluados ($p > 0,05$) (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia (%) de MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella* expuestas en ensayo agudo a 0,39 mg/l de IMZT (fase de exposición) y luego colocadas en agua de ensayo sin herbicida durante 7, 14 y 21 días (fase de post-exposición).

Tiempo (días)	Tratamiento	N° de células analizadas	Micronúcleos	Anormalidades nucleares			
				Hendiduras Nucleares	Núcleos Lobulados	Binucleadas	Buds o gemaciones
Fase de exposición							
0	Control	13405	4,95 ± 1,03	0,53 ± 0,23	1,66 ± 0,38	0,89 ± 0,28	2,46 ± 0,35
4	Control	14421	4,55 ± 1,09	0,63 ± 0,24	0,42 ± 0,17	1,35 ± 0,38	2,77 ± 0,37
	Pivot® H	15169	7,60 ± 0,98**	1,44 ± 0,36*	1,10 ± 0,25	1,93 ± 0,23	5,74 ± 0,84**
	CP ^a	15556	11,34 ± 2,18**	0,65 ± 0,25	2,12 ± 0,39**	2,26 ± 0,53	6,02 ± 1,00**
Fase de post-exposición							
11	Control	14302	6,00 ± 1,27	0,53 ± 0,19	0,47 ± 0,19	2,24 ± 0,65	5,96 ± 0,99
	Pivot® H	15753	5,11 ± 1,13	0,89 ± 0,29	0,26 ± 0,11	1,07 ± 0,37	5,13 ± 0,99
	CP ^a	15649	21,35 ± 2,51***	1,54 ± 0,59	0,90 ± 0,27	4,40 ± 1,35	6,07 ± 0,97
18	Control	12633	5,03 ± 1,23	0,95 ± 0,24	0,83 ± 0,29	1,94 ± 0,52	4,28 ± 1,03
	Pivot® H	15204	4,81 ± 1,20	0,32 ± 0,15	0,65 ± 0,18	1,09 ± 0,34	3,52 ± 0,59
	CP ^b	13437	5,68 ± 0,96	0,67 ± 0,26	0,60 ± 0,18	1,51 ± 0,56	2,99 ± 0,70
25	Control	15068	4,65 ± 1,82	1,03 ± 0,38	0,51 ± 0,19	1,18 ± 0,35	4,86 ± 0,87
	Pivot® H	15539	3,76 ± 0,78	0,77 ± 0,27	0,33 ± 0,16	1,22 ± 0,29	5,72 ± 1,01
	CP ^a	9329	4,94 ± 1,21	0,68 ± 0,45	0,43 ± 0,23	1,17 ± 0,31	3,64 ± 0,98

Los resultados son expresados como el número de anormalidades/1000 células ± ES. ^a, Ciclofosfamida (CP, 40 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

b. Daño en el ADN evaluado mediante el EC

En la tabla 11 se presentan los resultados del EC obtenidos en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *B. pulchella* luego de la fase de exposición aguda y post-exposición. Por otro lado, la figura 27 representa las frecuencias medias de las diferentes categorías de nucleoides para cada tiempo evaluado dentro del bioensayo de recuperación. Luego de la exposición aguda, los resultados mostraron que la exposición a CP induce un aumento significativo del IDG así como de la frecuencia de células dañadas respecto del control negativo ($p < 0,001$) (Tabla 11). Específicamente, este aumento se debió a un aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo III ($p < 0,001$) y IV ($p < 0,05$) acompañado por una consecuente disminución significativa de los nucleoides de tipo 0-I ($p < 0,001$) (Figura 27C). Por otra parte, en larvas

expuestas a IMZT se observó un aumento significativo en el IDG ($p < 0,01$) y en la frecuencia de las células dañadas con respecto a los controles negativos ($p < 0,01$) (Tabla 11). Particularmente, el aumento del daño genético en este caso fue debido a un aumento significativo en la frecuencia de nucleoides de tipo II ($p < 0,05$), III ($p < 0,01$) y IV ($p < 0,05$) acompañado por una disminución significativa de nucleoides de tipo 0-I ($p < 0,01$) (Figura 27B).

Tabla 11. Análisis del daño en el ADN evaluado mediante el ensayo cometa en células sanguíneas circulantes de larvas de *Boana pulchella* expuestas a 0,39 mg/l de IMZT por 4 días (fase de exposición) y posteriormente colocadas durante un periodo de 7, 14 y 21 días en agua de ensayo sin herbicida (fase de post-exposición)

Tiempo (días)	Tratamiento	N° de animales analizados	N° de nucleoides analizados	% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG \pm ES
<i>Fase de exposición</i>					
0	Control	15	1620	30,93	1,15 \pm 0,10
4	Control	15	1614	32,28	1,22 \pm 0,06
	Pivot® H	13	1362	50,44**	1,56 \pm 0,08**
	CP ^a	15	1633	53,77***	1,65 \pm 0,07***
<i>Fase de post-exposición</i>					
11	Control	14	1200	33,83	1,27 \pm 0,06
	Pivot® H	13	1341	32,21	1,26 \pm 0,07
	CP ^a	15	1676	38,31	1,33 \pm 0,08
18	Control	12	1100	37,64	1,19 \pm 0,05
	Pivot® H	13	1423	34,01	1,15 \pm 0,02
	CP ^a	13	1522	34,63	1,24 \pm 0,05
25	Control	13	1400	29,71	1,10 \pm 0,07
	Pivot® H	13	1515	33,93	1,23 \pm 0,06
	CP ^a	10	1000	28,43	1,19 \pm 0,05

^a, Ciclofosfamida (CP, 40 mg/l), usado como control positivo. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

En la fase de post-exposición, en aquellos tratamientos previamente expuestos a CP no se detectaron diferencias significativas en el IDG ($p > 0,05$) ni en la frecuencia de las células dañadas ($p > 0,05$) en comparación con el control negativo para todos los tiempos de exposición (Tabla 11; Figura 27C); mientras que, en larvas previamente expuestas a IMZT tampoco se detectaron diferencias significativas respecto del control negativo al evaluar el IDG ($p > 0,05$) y la frecuencia de las células dañadas ($p > 0,05$) para todos los tiempos post-exposición (Tabla 11; Figura 27B).

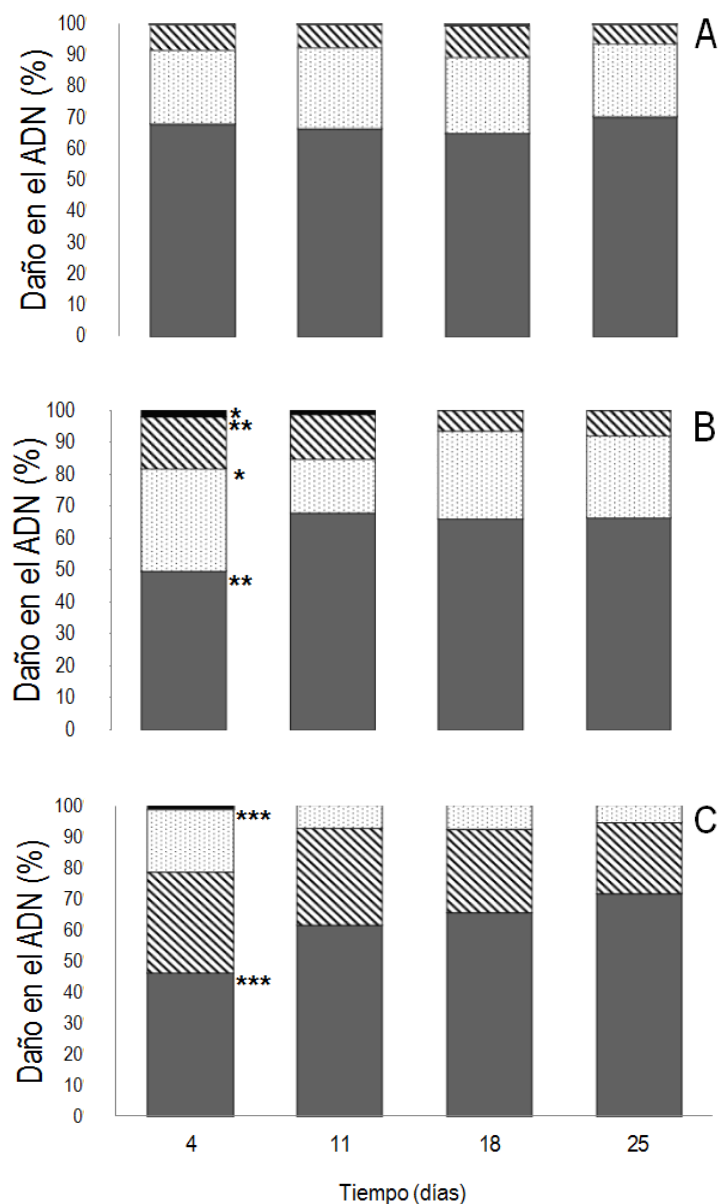


Figura 27. Categorías de daño en los nucleoides de células sanguíneas de larvas de *Boana pulchella* inducido por IMZT luego de 4 días de exposición aguda a 0,39 mg/l (fase de exposición) y posteriormente colocadas durante un periodo de 7, 14 y 21 días en agua de ensayo sin herbicida (fase de post-exposición) (B). Los gráficos de barra representan las frecuencias de nucleoides no dañados (tipo 0-I; sección de barra gris) y frecuencias de nucleoides dañados tipo II (secciones con líneas negras en la barra), tipo III (secciones con puntos negros en la barra) y tipo IV (secciones negras en las barras) para cada tiempo de exposición evaluado en el ensayo de recuperación correspondientes al grupo control sin tratamiento (A), fase de exposición y post-exposición (B) y control positivo (C, 40 mg/l de ciclofosfamida). Los resultados son expresados como el porcentaje promedio de cada categoría de nucleóide por tratamiento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; diferencias significativas respecto de los valores del grupo control.

4.3.3 Efectos a nivel bioquímico

Larvas

Las respuestas obtenidas de los puntos finales bioquímicos evaluados luego de la exposición aguda a IMZT en larvas de *B. pulchella* se representan en la figura 28 para la actividad de CAT y AChE. En el caso de las enzimas de estrés oxidativo, se observó una disminución significativa en la actividad de CAT en las larvas tratadas entre 0,39 y 1,55 mg/l de IMZT a las 48 h ($p < 0,05$) y entre 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT a las 96 h ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 28A). Por otro lado, la actividad de GST no se vio alterada por la exposición a IMZT a las 48 h ($p > 0,05$) pero si hubo alteraciones por incremento en la actividad de esta enzima al evaluarla en larvas expuestas durante 96 h para todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,01$) (Figura 28B). Finalmente, se observó un aumento significativo en la actividad de AChE solo en aquellas larvas expuestas a 1,17 mg/l de IMZT tanto a las 48 ($p < 0,001$) como a las 96 h ($p < 0,05$) (Figura 28C).

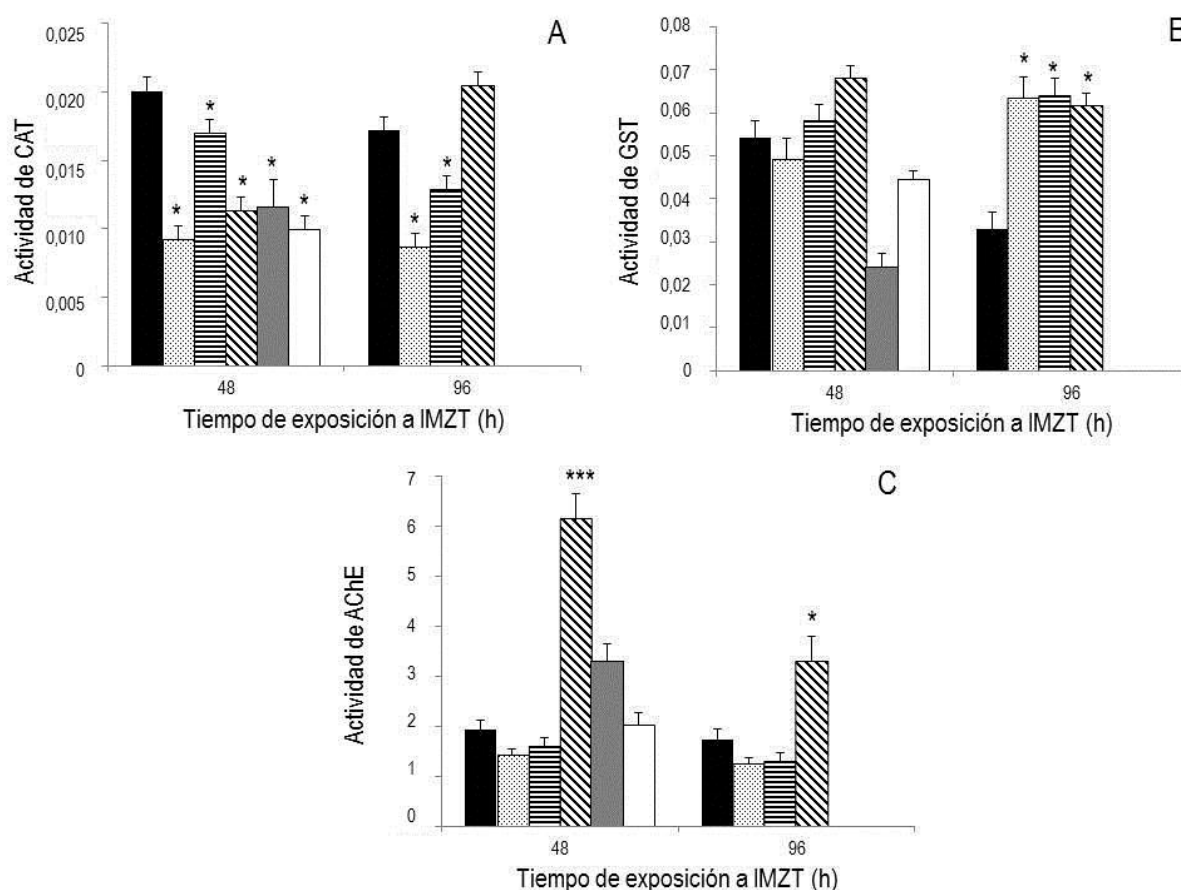


Figura 28. Actividad de las enzimas CAT (A), GST (B) y AChE (C) en larvas de *B. pulchella* expuestas a diferentes concentraciones de IMZT en diferentes tiempos. Las barras negras representan el control negativo y el resto de las barras representan las distintas concentraciones de exposición a IMZT evaluadas tales como 0,39 mg/l (barras de puntos), 0,78

mg/l (barras con líneas horizontales), 1,17 mg/l (barras con diagonales), 1,36 mg/l (barras gris) y 1,55 mg/l (barras blanca). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, diferencias significativas con respecto a los valores de control. La actividad de cada enzima está expresada como mmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ en el caso de CAT y en μmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹ para GST y AChE. Las líneas con bigotes representan el ES. A las 96 h sólo se representan los resultados en concentraciones menores a 1,17 mg/l debido a que por encima de esa concentración ocurre una elevada mortalidad lo que dificultó realizar las mediciones enzimáticas debido al bajo o nulo “*n*” muestral.

Adultos

Por otro lado, las evaluaciones de puntos finales bioquímicos en adultos de *B. pulchella* luego de la exposición en un pulso agudo a IMZT revelaron que todas las enzimas presentan alteraciones en su actividad a las 48 h ($p < 0,05$) y sólo se observaron diferencias en la actividad de GST al cabo de las 96 h ($p > 0,05$). Específicamente, en las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo se observó una disminución significativa en la actividad de la enzima CAT en las ranas de la S1 y S2 ($p < 0,05$) mientras que se observó una disminución significativa de GST para todos los escenarios de exposición (S1, S2 y S3) ($p < 0,05$) (Figura 29A, B). En tanto que los análisis de la respuesta de AChE revelaron que su actividad es alterada por la acción de IMZT en S3 ($p > 0,05$) (Figura 29C). Cuando las respuestas enzimáticas fueron evaluadas luego de 96 h, sólo se observó una disminución significativa en la actividad de GST en aquellas de S1 ($p < 0,05$) (Figura 29B), mientras que no hubieron alteraciones en las respuestas CAT y AChE frente los escenarios de exposición evaluados ($p > 0,05$).

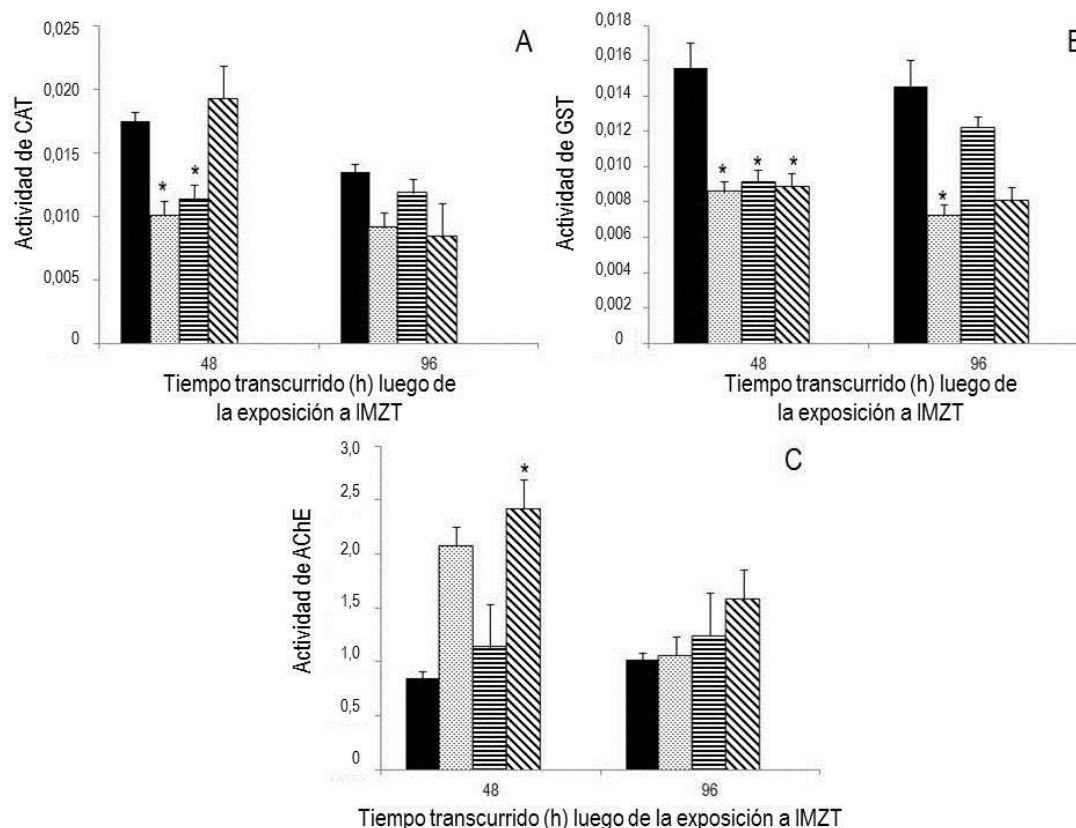


Figura 29. Respuesta bioquímica en adultos de *B. pulchella* expuestos en diferentes escenarios a IMZT. Los gráficos representan las actividades enzimáticas de CAT (A), GST (B) y AChE (C) evaluadas para ambos tiempos transcurridos desde el pulso agudo de exposición. La figura representa el control negativo (barras negras), S1 (barras con puntos), S2 (barras con líneas verticales) y S3 (barras grises). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, diferencias significativas con respecto a los valores de control. La actividad de cada enzima está expresada como $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ en el caso de CAT y en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ para GST y AChE. Las líneas con bigotes representan el ES.

4.3.4 Efectos a nivel histológico en larvas

4.3.4.1 Pigmentación de MMCs hepáticos

Los resultados histológicos obtenidos de la respuesta de los MMC hepáticos de larvas de *B. pulchella* luego de la exposición aguda a Pivot® H son expresados en la figura 30. Particularmente, los análisis sobre la respuesta de los MMC hepáticos en larvas de esta especie revelaron un aumento significativo de la frecuencia de MMC por área (Figura 30) en aquellas larvas expuestas a IMZT en las menores concentraciones evaluadas (intervalo entre 0,40 a 1,22 mg/l de IMZT) luego de 96 h ($p < 0,05$). En contraste, para las mayores concentraciones de IMZT evaluadas en larvas de *B. pulchella*, desde 1,36 a 1,63 mg/l de IMZT, no se observaron diferencias significativas en el número de MMC por área respecto del grupo control ($p > 0,05$).

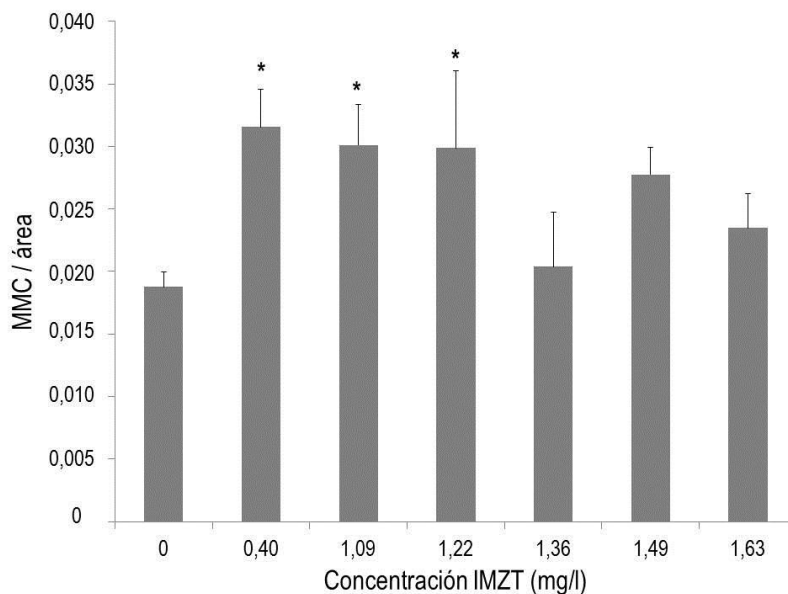


Figura 30. Respuesta de los MMCs en el hígado de larvas de *Boana pulchella* del grupo control comparados con aquellas larvas expuestas a Pivot® H. *, $p < 0,05$; diferencias significativas con respecto a los valores de control. Las líneas con bigotes representan el ES.

4.3.4.2 Patologías hepáticas

Las patologías hepáticas detectadas en el hígado de larvas de *B. pulchella* fueron atrofia de hepatocitos, esteatosis e HV de acuerdo a las categorías propuestas por Çakici y col. (2015) adaptado para larvas. Particularmente, los análisis descriptivos permitieron identificar lesiones severas y agudas en la patología definida como HV (Figura 31B) y los análisis estadísticos revelaron que estas lesiones ocurren en las mayores concentraciones ensayadas, detectándose diferencias significativas entre 1,36 y 1,49 mg/l de IMZT ($p < 0,05$). Por otro lado, las patologías reconocidas como atrofia de hepatocitos y esteatosis no fueron significativas en las larvas tratadas con IMZT respecto del grupo control ($p > 0,05$).

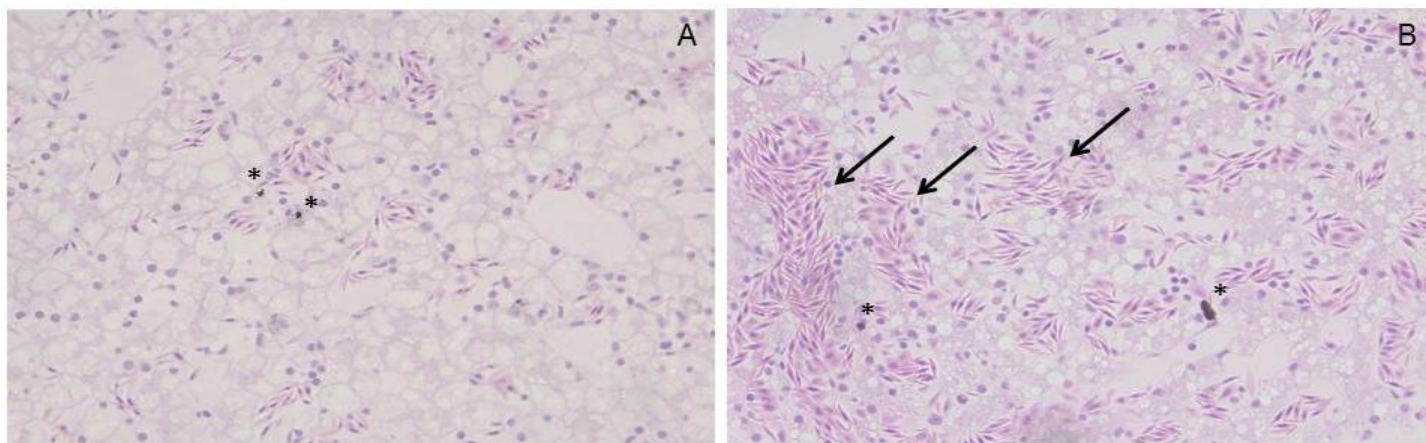


Figura 31. Histopatologías y MMCs en hígados de larvas de *Boana pulchella* del grupo control (A) y expuestos a Pivot® H en una concentración de 1,49 mg/l de IMZT (B). Las flechas indican zonas de hipervascularización; *, indica la presencia de MMCs.

4.3.5. Efectos a nivel de individuo

4.3.5.1 Efectos subletales en el comportamiento

Larvas

Los resultados revelaron que luego de 24 h de exposición con IMZT hubo alteraciones en la actividad natatoria por presencia de los efectos caracterizados como IS e IM en el estadio GS25 ($p < 0,001$), pero no en los tratamientos con IMZT superiores al tiempo de exposición de 48 h ($p > 0,05$). Los valores de NOEC y LOEC obtenidos para el GS25 luego de 24 h de exposición fueron 0,95 y 1,02 mg/l IMZT y 1,02 y 1,09 mg/l IMZT para IS e IM, respectivamente. Por otro lado, en las larvas en GS36, se observó IS luego de 24 h ($p < 0,05$) y 48 h ($p < 0,01$) de exposición al herbicida. En este caso, los valores NOEC y LOEC para IS fueron de 1,09 y 1,17 mg/l IMZT, respectivamente.

Los análisis de regresión demostraron que en larvas GS25 la respuesta IS varía de forma dependiente de la concentración de IMZT a las 24 h ($r = 0,98$; $p < 0,001$) pero no a las 48 h ($p > 0,05$). Esta relación concentración-respuesta permitió estimar un valor de $EC_{50_{24h}}$ de 1,15 mg/l IMZT (límites de confianza 95%; 1,04–1,27 mg/l IMZT) para este punto final. Por otro lado, en larvas del GS36 expuestos a IMZT la alteración del comportamiento a las 24 h no resultó ser dependiente de la concentración de IMZT ($p < 0,05$).

Adultos

En adultos de *B. pulchella*, no se evidenciaron efectos en el comportamiento por la exposición experimental a IMZT al comparar con el grupo control ($p > 0,05$). No obstante, cabe destacar que en ambos escenarios de exposición a IMZT en una baja frecuencia de individuos ($< 5\%$) se evidenció un comportamiento anormal caracterizado por un letargo en la respuesta luego de un estímulo mecánico externo y estos individuos se encontraban reposando sobre el sustrato, no adheridos a los márgenes de las cámaras de ensayos como sucedía en los controles.

4.3.5.2 Efectos subletales en el crecimiento y desarrollo e índices de condición corporal

a. Efectos agudos en larvas

Luego de la exposición aguda a IMZT, no se detectaron alteraciones en el crecimiento y el desarrollo en larvas de ambos estadios al comparar respecto del grupo control ($p > 0,05$).

b. Efectos crónicos en larvas

Los resultados demostraron que IMZT a bajas concentraciones en una exposición crónica produce efectos adversos a nivel de individuo tales como una disminución significativa de la condición corporal y un retraso de la metamorfosis en larvas de *B. pulchella* (Figura 32). Particularmente, se observó una disminución significativa en el índice K en aquellas larvas expuestas a IMZT desde el día 28 hasta el día 42 del bioensayo crónico ($p < 0,05$). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas hacia el día 49 del bioensayo (final) en el índice K de las larvas tratadas con IMZT respecto del control negativo dado que estos alcanzaron la metamorfosis ($p > 0,05$). En el caso de la respuesta evaluada según el estadio de desarrollo, se detectaron diferencias significativas respecto del grupo control a partir del día 42 hasta el final del ensayo (día 49) con un marcado retraso en la metamorfosis en aquellos individuos expuestos crónicamente a IMZT ($p < 0,05$).

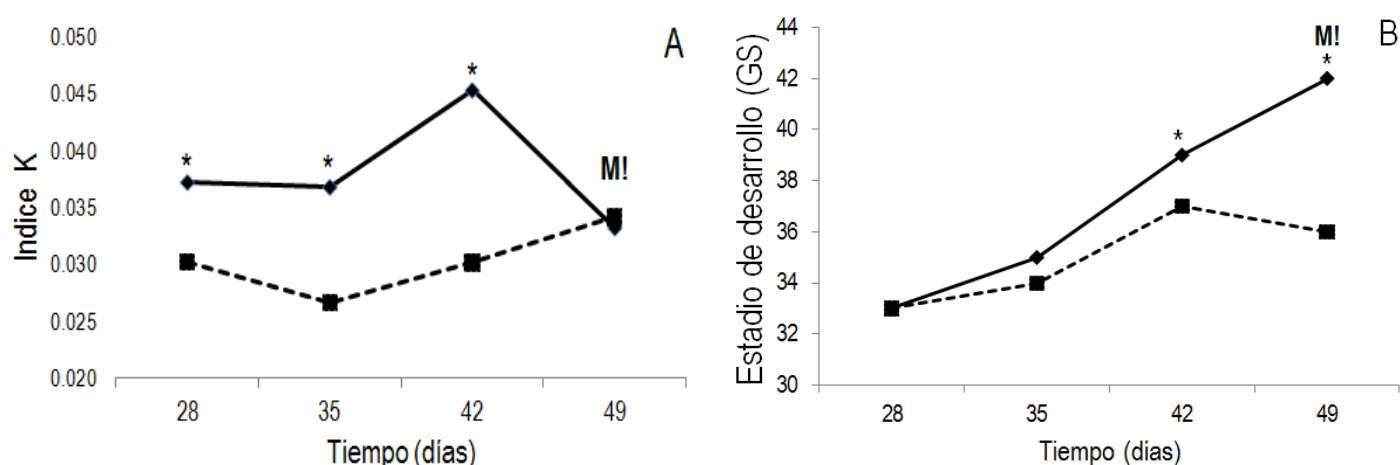


Figura 32. Efectos a nivel de individuo producidos por IMZT en larvas de *B. pulchella* en ensayo de exposición crónica a 0,19 mg/l. Las líneas negras sólidas representan el grupo control mientras que las líneas negras discontinuas representan aquellas larvas tratadas con IMZT. Los puntos finales individuales quedan representados por el índice K (A) y el estadio de desarrollo según Gosner (B). M!: representa el momento en que el 80% de las larvas del grupo control alcanzaron la metamorfosis. * $p < 0,05$ (diferencias significativas respecto de los valores del grupo control).

c. Crecimiento, desarrollo y masa corporal en ensayo de recuperación

El análisis del t-test reveló que durante la fase de exposición aguda a los distintos tratamientos, los resultados no mostraron alteraciones el crecimiento corporal y la masa corporal entre las larvas expuestas a Pivot® H y el grupo control negativo ($p > 0,05$). Resultados similares también se observaron durante la fase de post-exposición ($p > 0,05$). Por otra parte, no se detectaron diferencias en la tasa de desarrollo entre las larvas expuestas y no expuestas durante la fase de exposición ($p > 0,05$), mientras que se observó una disminución significativa durante la fase de post-exposición ($p < 0,05$). Los resultados demostraron que al final de la fase de post-exposición (día 25) el 47% de las larvas expuestas a IMZT alcanzaron el GS42 mientras que en el grupo control el 76% de los individuos alcanzó el GS42 ($p < 0,05$).

d. Efectos agudos en adultos

En el caso de adultos de *B. pulchella*, se detectaron alteraciones en el índice K debido a una significativa disminución luego de transcurridas 48 h de la exposición ($p < 0,05$) en la situación S3 pero no se detectaron diferencias respecto del grupo control luego las 96 h. En el caso del IHS, el índice gonadosomático y de cuerpos grasos no se detectaron efectos adversos en los tres escenarios diferentes de exposición a IMZT para ambos tiempos de exposición evaluados ($p > 0,05$).

4.3.5.3 Efectos subletales por presencia de anomalías morfológicas

a. Efectos agudos en larvas

En los análisis realizados sobre larvas GS36 de *B. pulchella* se detectaron diferentes anomalías tales como anomalías del eje axial y/o disminución en la frecuencia de los queratodontes. De cualquier manera, entre todas las anomalías morfológicas detectadas, el análisis estadístico de ANOVA demostró diferencias significativas respecto del control negativo ($p < 0,01$) en la anomalía morfológica descrita como disminución o pérdida parcial o total en la frecuencia de queratodontes (ver Fig. 1, publicación 1, Anexo I). Para esta anomalía morfológica, los valores NOEC y LOEC fueron 0 y 0,41 mg IMZT /L, respectivamente. En general, el análisis de regresión demostró que la pérdida en los queratodontes varía positivamente con el aumento de la concentración de IMZT ($r = 0,33$, $p < 0,05$).

b. Efectos en ensayo de recuperación

Las anomalías morfológicas observadas en las larvas expuestas a IMZT son presentadas en la Figura 33 y por otro lado la prevalencia de anomalías se puede observar en la Figura 3 de la publicación 3 (Anexo I). El t-test demostró una pérdida de los queratodontes al final de la fase de exposición con respecto al control negativo ($p < 0,05$) así como también para los días 11, 18 y 25 días durante la fase de post-exposición ($p < 0,05$) (Figura 33A, B). Además, se observaron anomalías en el eje axial (flexión lateral de la cola) en las larvas analizadas luego de 18 y 25 días del inicio del bioensayo ($p < 0,05$) (Figura 33C, D).

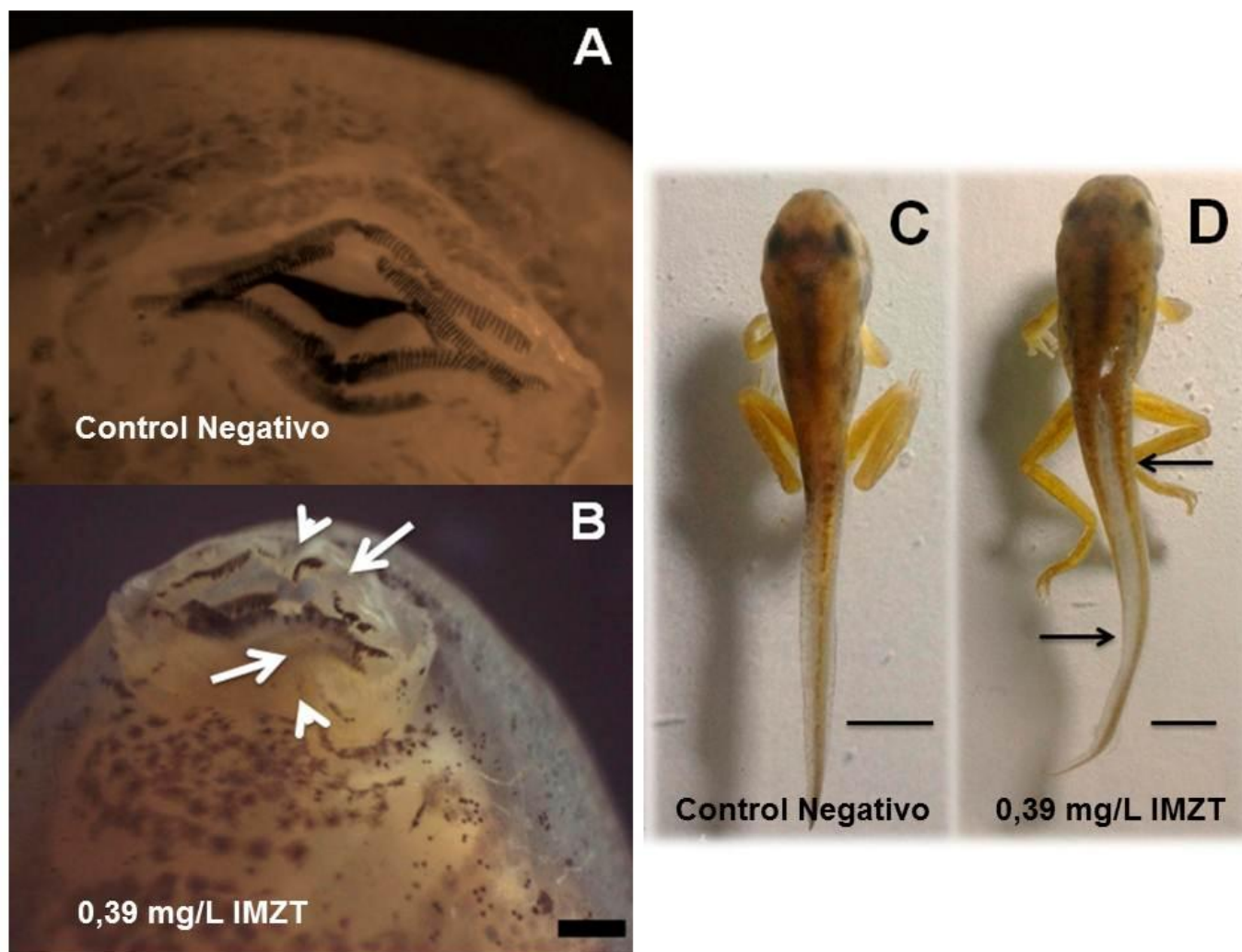


Figura 33. Anormalidades en el disco oral (B) y en el eje axial (D) en larvas de *Boana pulchella* expuestas a 0,39 mg/l de IMZT durante 4 días (fase de exposición) y luego colocadas en agua de ensayo sin herbicida durante 7, 14 y 21 días. (A) Vista ventral de una larva en GS36 del grupo control en donde se observa la disposición normal de las hileras de queratodontes. (B) Larva expuesta en GS36 expuesta al herbicida y que permaneció en agua de bioensayo sin herbicida durante 7 días (día 11, fase de post-exposición), la cual presenta pérdida de queratodontes en forma parcial de la primer hilera superior e inferior y pérdida total de la última hilera superior e inferior. Las flechas indican pérdida parcial y las cabezas de flechas indican pérdida total de la hilera de queratodontes. (C) Vista dorsal de una larva del control negativo en GS42 que no presenta anomalías en el eje axial. (D) Vista dorsal de una larva en GS42 expuesta durante 4 días al herbicida y luego colocada en agua de ensayo sin herbicida durante 21 días, en la cual se observa una flexión lateral del eje axial (flechas). Las barras representan 0,5 mm (A, B) o 5 mm (C, D).

c. Efectos agudos en adultos

Por otra parte, cuando este punto final individual fue evaluado en adultos, no se detectaron anomalías morfológicas producidas por la exposición a IMZT en su formulado Pivot® H ($p > 0,05$).

4.4. Efectos letales y subletales de IMZT en larvas y adultos de *Leptodactylus latinasus*

4.4.1 Efectos letales en larvas

Los resultados de los bioensayos de toxicidad aguda en *L. latinasus* revelaron que IMZT produce efectos letales en larvas de la especie. Específicamente, el análisis Probit demostró que la mortalidad tiene un aumento significativo dependiente de la concentración de IMZT tanto en el GS25 ($r = 0,97$; $p < 0,05$) como en el GS36 ($r = 0,96$; $p < 0,01$). Sumado a esto, los datos permitieron determinar los valores de CL50 de IMZT después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición. Particularmente, los valores de CL50 permanecen constantes en GS25 para todos los tiempos evaluados ($p > 0,05$) pero muy diferente es la situación en el GS36 donde se observó una variación significativa de los valores de CL50 a partir de las 72 h ($p < 0,05$). En las larvas GS25, los resultados mostraron para todos los tiempos un valor de CL50_{24-96h} de 1,01 mg/l IMZT (límites de confianza 95%: 0,27-3,20). Finalmente, en este caso los valores NOEC y LOEC alcanzaron valores de 0,95 y 1,36 mg/l de IMZT, respectivamente.

Por otra parte, en larvas del GS36, hasta las 48 h los resultados mostraron un valor de CL50_{24-48h} de 1,63 mg/l de IMZT (límites de confianza del 95%: 1,42-1,99) y valores de CL1 y CL10 de 0,79 (límites de confianza del 95%: 0,43-0,99) y 1,10 (límites de confianza del 95%: 1,42-1,99) mg/l de IMZT, respectivamente; mientras que luego de las 96h el valor de CL50_{72-96h} fue de 0,29 mg/l de IMZT (límites de confianza del 95%: 0,08-0,46) y los valores de CL1 y CL10 fueron 0,06 (límites de confianza del 95%: 0,001-0,11) y 0,99 (límites de confianza del 95%: 0,004-0,20) mg/l de IMZT, respectivamente. Sumado a esto, hasta las 48 h los valores de NOEC_{24-48h} y LOEC_{24-48h} fueron 1,63 y 2,72 mg/l de IMZT ($p < 0,01$), respectivamente; mientras que después de 96 h los valores NOEC_{72-96h} y LOEC_{72-96h} fueron 0,22 y 0,27 mg/l de IMZT ($p < 0,01$), respectivamente. Finalmente, cuando se compararon los valores de CL50 según el estadio de desarrollo de las larvas (GS25 y GS36) los resultados mostraron diferencias significativas en los valores CL50 de las 96 h ($p < 0,05$) pero no para los valores de LOEC obtenidos para ese tiempo ($p > 0,05$).

4.4.2 Efectos a nivel citogenético

4.4.2.1 MNs y anormalidades nucleares

Larvas

La tabla 10 resume los resultados del análisis de MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos de larvas de *L. latinasus* inducidos por la exposición a IMZT. Específicamente, se observó un incremento en la frecuencia de MNs para larvas expuestas a CP (control positivo) luego de las 48 ($p < 0,05$) y 96 h de exposición ($p < 0,001$) a Pivot® H. Por otra parte, los resultados demostraron que IMZT indujo aumento de la frecuencia de MNs tanto a las 48 como a las 96 h de exposición ($p < 0,05$). Particularmente, el aumento significativo de la frecuencia de MNs en ambos tiempos ocurrió en

larvas expuestas a la mayor concentración ensayada, 0,22 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) respecto del control negativo. Cuando se analizaron las anormalidades nucleares a 0,22 mg/l, se observó un aumento significativo en la frecuencia de Buds o gemaciones para ambos tiempos en aquellas larvas expuestas. A su vez, se detectó un aumento de HNs a las 48 h. Por otra parte, también se registró un aumento significativo en la frecuencia de NLs en larvas luego de 96 h ($p < 0,001$) (Tabla 12). Sumado a esto, resulta importante destacar que se detectó el aumento significativo de EPs en aquellas larvas expuestas a las menores concentraciones subletales equivalente a 0,07 ($p < 0,05$) y 0,15 mg/l IMZT ($p < 0,01$) luego de 96 h (Tabla 12). No obstante, en las larvas expuestas a IMZT no se observaron anormalidades nucleares significativas en las frecuencias de BNs respecto a los valores del control negativo ($p > 0,05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencia (%) de MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *L. latinasus* expuestos al herbicida IMZT en el formulado Pivot® H

Tiempo (h)	Trat. (mg/l)	N° células analizadas	Micronúcleos	Anormalidades nucleares				
				Hendiduras Nucleares	Núcleos Lobulados	Binucleadas	Buds o gemaciones	Eritroplástidos
48	Control	14653	1,70±0,25	0,07 ± 0,07	1,03 ± 0,28	0,34 ± 0,16	3,00 ± 0,40	1,23 ± 0,38
	CP ^a	15606	3,13±0,41*	0,82 ± 0,29*	1,47 ± 0,48	0,51 ± 0,25	6,07 ± 1,32*	1,68 ± 0,34
	0,07	15662	1,80±0,24	0,07 ± 0,07	0,31 ± 0,12	0,51 ± 0,22	3,77 ± 0,59	0,81 ± 0,29
	0,15	15540	2,57±0,51	0,13 ± 0,09	0,70 ± 0,20	0,26 ± 0,11	3,93 ± 0,77	1,17 ± 0,29
	0,22	15325	3,12±0,53*	0,58 ± 0,24*	1,73 ± 0,41	0,74 ± 0,18	6,36 ± 1,29**	2,22 ± 0,96
96	Control	14572	1,43±0,27	0,41 ± 0,17	0,62 ± 0,37	0,41 ± 0,21	2,36 ± 0,68	0,49 ± 0,24
	CP ^a	13055	5,52±1,56***	0,52 ± 0,32	2,31 ± 0,58**	0,60 ± 0,28	6,81 ± 1,05***	1,57 ± 0,73
	0,07	13138	1,63±0,32	0,65 ± 0,37	0,60 ± 0,21	1,43 ± 0,62	2,65 ± 0,63	3,61 ± 1,63*
	0,15	15351	1,83±0,37	0,19 ± 0,10	0,85 ± 0,25	0,45 ± 0,16	2,29 ± 0,69	2,67 ± 0,52**
	0,22	15533	2,40±0,32*	0,52 ± 0,16	2,52 ± 0,51***	0,84 ± 0,23	8,55 ± 0,95***	0,58 ± 0,23

Los resultados son expresados como el número de anormalidades/1000 células ± ES. ^a Ciclofosfamida (CP, 40 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$, indican las diferencias significativas respecto del control negativo.

Adultos

Finalmente, los resultados del análisis de MNs en adultos de *L. latinasus* reveló que IMZT es capaz de inducir un aumento significativo de MNs luego de 96 h de un pulso agudo de exposición (Tabla 13). Particularmente, se observó un aumento significativo en la frecuencia de MNs por la exposición a IMZT en el grupo S1 ($p < 0,01$) pero no en S2 ($p > 0,05$) cuando se comparó con respecto a grupo de control a las 96 h. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas por tratamiento con IMZT respecto al grupo de control cuando se analizó la frecuencia de anormalidades nucleares en eritrocitos para ambos escenarios y en los dos tiempos evaluados luego del pulso inicial de exposición ($p > 0,05$) (Tabla 13).

Tabla 13. Puntos finales en diferentes niveles ecológicos evaluados en adultos de *Leptodactylus latinasus* expuestos a la formulación Pivot® H del herbicida IMZT en ambos tiempos de exposición

Nivel de organización	Punto final	48 h		96 h	
		S1	S3	S1	S3
Individual	<i>Comportamiento</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>Condición corporal</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>Índice hepatosomático</i>	ND	ND	(-) *	(-) *
Histológicos	<i>Histopatologías</i>				
	<i>HV</i>	ND	(+) *	ND	(+) *
	<i>AS</i>	ND	(+) *	ND	(+) *
	<i>MI</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>V</i>	ND	ND	ND	ND
	<i>Pigmentación en MMCs</i>				
	<i>Melanina</i>	ND	ND	(-) *	(-) *
	<i>Hemosiderina</i>	ND	ND	(-) *	ND
	<i>Lipofuscina</i>	(+) *	ND	ND	ND
Bioquímicos	<i>GST</i>	(-) *	ND	ND	ND
	<i>CAT</i>	ND	ND	(+) *	ND
	<i>AChE</i>	ND	(+) *	ND	ND
Celular	<i>MNs</i>	ND	ND	(+) *	ND
	<i>Anormalidades nucleares</i>	ND	ND	ND	ND

Respuesta o función de los biomarcadores respecto al grupo control con estimulación / aumento (+) o inhibición / disminución (-). ND: efecto no detectado. S1; Corresponde al escenario de escorrentía a 10 mg/l de IMZT y S3; Corresponde a la aplicación directa de pulverización a 1000 mg/l de IMZT. *, $p < 0,05$; diferencias significativas con respecto al control.

4.4.2.2 Daño en el ADN detectados por EC

Larvas

Los resultados obtenidos del EC en eritrocitos de sangre periférica de larvas de *L. latinasus* expuestos durante 48 y 96 h a IMZT se presentan en Tabla 14, y las frecuencias medias de las categorías de daño en los nucleoides se representan en Fig. 34. Los análisis revelaron que el tratamiento con CP indujo un aumento significativo del IDG así como en la frecuencia de las células dañadas luego de comparar con los resultados obtenidos en los controles negativos tanto en larvas expuestas a las 48 ($p < 0,001$) como a las 96 h ($p < 0,05$) (Tabla 14). Por otra parte, los tratamientos con IMZT revelaron que el herbicida es capaz de inducir un aumento significativo del IDG a las 48 h de tratamiento para todas las concentraciones ensayadas ($p < 0,05$) (Tabla 14). Específicamente, para estas larvas expuestas a IMZT durante 48 h, se observó un aumento significativo de la frecuencia de nucleoides de tipo II a 0,07 mg/l de IMZT ($p < 0,05$), tipo III en 0,15 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) y tipo III y IV en 0,22 mg/l de IMZT ($p < 0,05$), acompañado por una consecuente disminución de los nucleoides de tipo 0-I ($p < 0,01$) para todas las concentraciones ensayadas (Figura 33A). El análisis en larvas expuestas durante 96 h reveló un aumento significativo en el IDG para 0,07 y 0,15 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) (Tabla 14). En

otras palabras, dicho aumento se debió a un aumento significativo en la frecuencia de los nucleoides de tipo II y III para 0,07 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) y de los nucleoides de tipo II, III y IV para 0,15 mg/l de IMZT ($p < 0,05$); con una resultante disminución de los nucleoides tipo 0-I ($p < 0,05$) (Fig. 34B).

Tabla 14. Análisis del daño del ADN medido por el ensayo de cometa en células sanguíneas circulantes de larvas de *Leptodactylus latinasus* expuestas al herbicida IMZT en el formulado Pivot® H

Tiempo (h)	Tratamiento	Concentración (mg/l)	N° de animales analizados	N° de nucleoides analizadas	% de células dañadas (II+III+IV)	IDG \pm ES ^a
48	Control negativo	0	14	1447	29,04	1,12 \pm 0,09
	Pivot® H	0,07	14	1436	50,79**	1,46 \pm 0,11*
		0,15	13	1356	46,06*	1,47 \pm 0,12*
		0,22	14	1466	47,39*	1,54 \pm 0,10**
	CP ^b	40	15	1694	57,75***	1,76 \pm 0,12***
96	Control negativo	0	13	1557	28,53	1,17 \pm 0,05
	Pivot® H	0,07	15	1817	49,54*	1,53 \pm 0,11*
		0,15	15	1861	49,24*	1,52 \pm 0,14*
		0,22	15	1685	20,50	0,96 \pm 0,09
	CP ^b	40	13	1431	42,94*	1,43 \pm 0,10*

^a, IDG: índice de daño genético. ^b, Ciclofosfamida (CP, 40 mg/l), usado como control positivo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; indican diferencias significativas respecto del grupo control negativo.

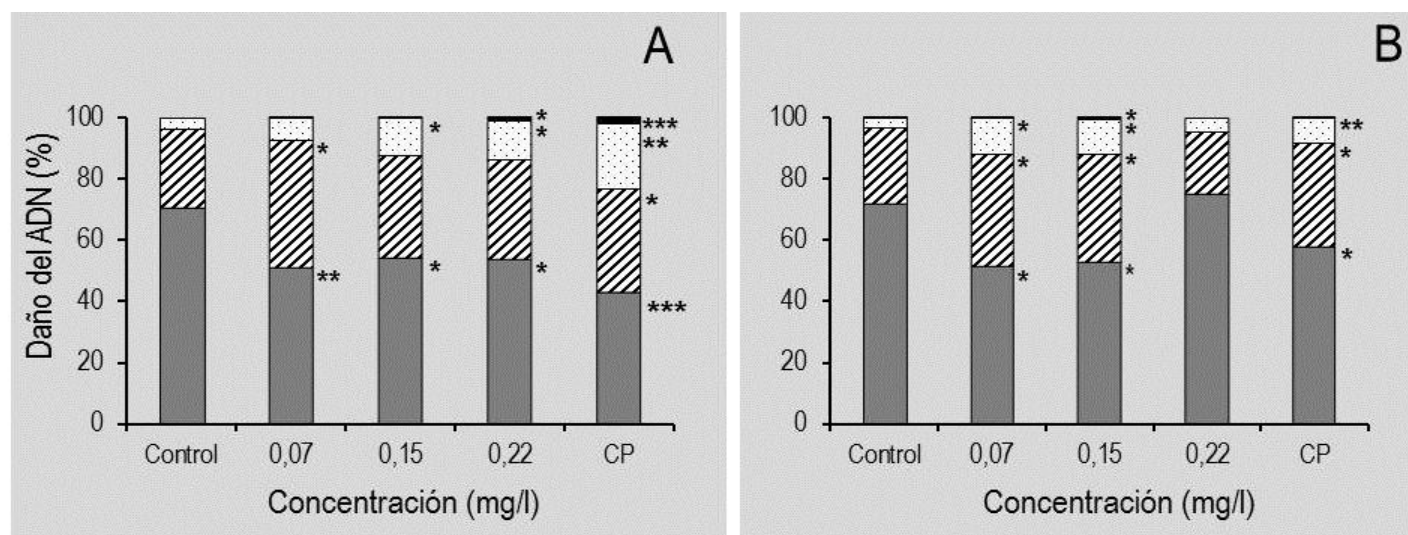


Figure 34. Categorías de daño en los nucleoides inducido por Pivot® H utilizando el ensayo cometa en células de sangre periférica de larvas de *L. latinasus* expuestas durante 4 d. Se determinaron las frecuencias de los nucleoides no dañados (nucleoides de tipo 0-I, barras de color gris oscuro), de tipo II (barras con líneas diagonales negras), de tipo III (secciones de barras con puntos negros) y nucleoides de tipo IV (barras negras) analizando 100 nucleoides de cada larva. La figura representa controles negativos (A) y los grupos tratados con IMZT (B) junto con los controles positivos (CP, 40 mg/l) a cada tiempo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, diferencias significativas con respecto a los valores de control.

4.4.3 Efectos a nivel bioquímico

Larvas

Los resultados demostraron que IMZT produce alteraciones en la actividad de las enzimas evaluadas tanto en larvas como en el hígado de adultos de *L. latinasus*. La figura 35 representa la respuesta de GST en larvas de *L. latinasus* evaluada luego de la exposición aguda a IMZT. Específicamente, los resultados mostraron un incremento significativo en la actividad de la enzima GST sólo en las larvas tratadas con 0,14 mg/l de IMZT ($p < 0,05$). A pesar de esto, no se detectaron diferencias significativas cuando se evaluó la actividad de AChE y CAT ($p > 0,05$) para todas las concentraciones de exposición respecto del grupo control en larvas de la especie. Por último, el análisis de la actividad de las enzimas después de 96 h en las larvas expuestas al IMZT demostró que para ese tiempo se produce el mismo efecto que a las 48 h con aumento significativo de la actividad de GST sólo a 0,14 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) y sin registrarse alteraciones significativas en la actividad de CAT y AChE con respecto al grupo control ($p > 0,05$).

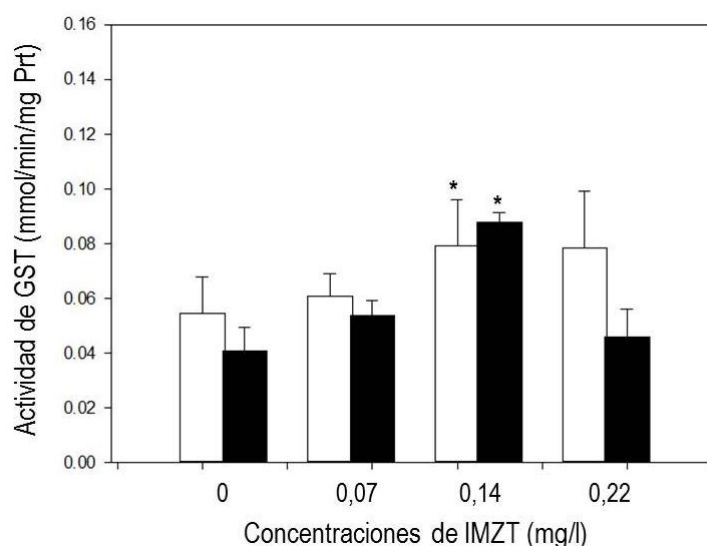


Figura 35. Actividad de GST en larvas de *L. latinasus* expuestas a IMZT en su formulado Pivot H®. Las barras blancas muestran la respuesta de GST a las 48 h, mientras que las barras negras indican la actividad promedio de GST a las 96 h. *, indica un $p < 0,05$.

Adultos

La tabla 13 resume los resultados de los análisis bioquímicos para cada escenario de exposición considerado después de 48 y 96 h del pulso agudo. Particularmente, los resultados mostraron una disminución significativa en la actividad de la enzima GST en ranas de S1 ($p < 0,05$) y un aumento significativo en la actividad de AChE en ranas del S3 ($p < 0,05$). Por otro lado, después de 48 h no se detectaron alteraciones significativas en la actividad de CAT por tratamiento con IMZT al comparar ambos escenarios con respecto al grupo de control ($p > 0,05$). Finalmente, cuando se

analizó la respuesta de las enzimas después de 96 h, no se observaron alteraciones significativas en la actividad de GST y AChE con respecto al grupo de control en ranas expuestas a IMZT en ambos escenarios ($p > 0,05$) y contrariamente a lo sucedido en las 48 h, el análisis reveló que la actividad de CAT aumenta significativamente por el tratamiento con IMZT en ranas de la S1 ($p < 0,01$).

4.4.4. Efectos a nivel histológico en adultos de *Leptodactylus latinasus*

4.4.4.1 Pigmentación de MMCs hepáticos

Los resultados de los puntos finales histológicos para cada escenario de exposición considerado se resumen en la Tabla 13. El análisis de pigmentos en los MMC del hígado reveló una disminución significativa de la melanina y hemosiderina a las 96 h (Tabla 13). Específicamente, los análisis demostraron que luego de las 48 h de exposición a IMZT en un pulso agudo no hubo diferencias significativas del área ocupada por los pigmentos melanina y hemosiderina en MMCs hepáticos en ranas tratadas con el herbicida respecto del control negativo ($p > 0,05$). Sin embargo, después de 96 h del pulso agudo a IMZT se detectó una disminución significativa del área de melanina en ambos escenarios ($p < 0,05$, Figura 36B) junto a una disminución significativa del área pigmentada de hemosiderina en MMC hepáticos sólo en ranas de la S1 ($p < 0,05$) y no para las ranas de la S3 ($p > 0,05$). Cuando se comparó el área ocupada de lipofuscina en los MMC hepáticos entre ambos escenarios y el grupo control, los resultados revelaron un aumento significativo del área ocupada por lipofuscina en aquellas ranas del S1 ($p < 0,05$) luego de 48 h y esta situación no se dio en las ranas de S3 las cuales no mostraron diferencias significativas respecto del grupo control ($p > 0,05$).

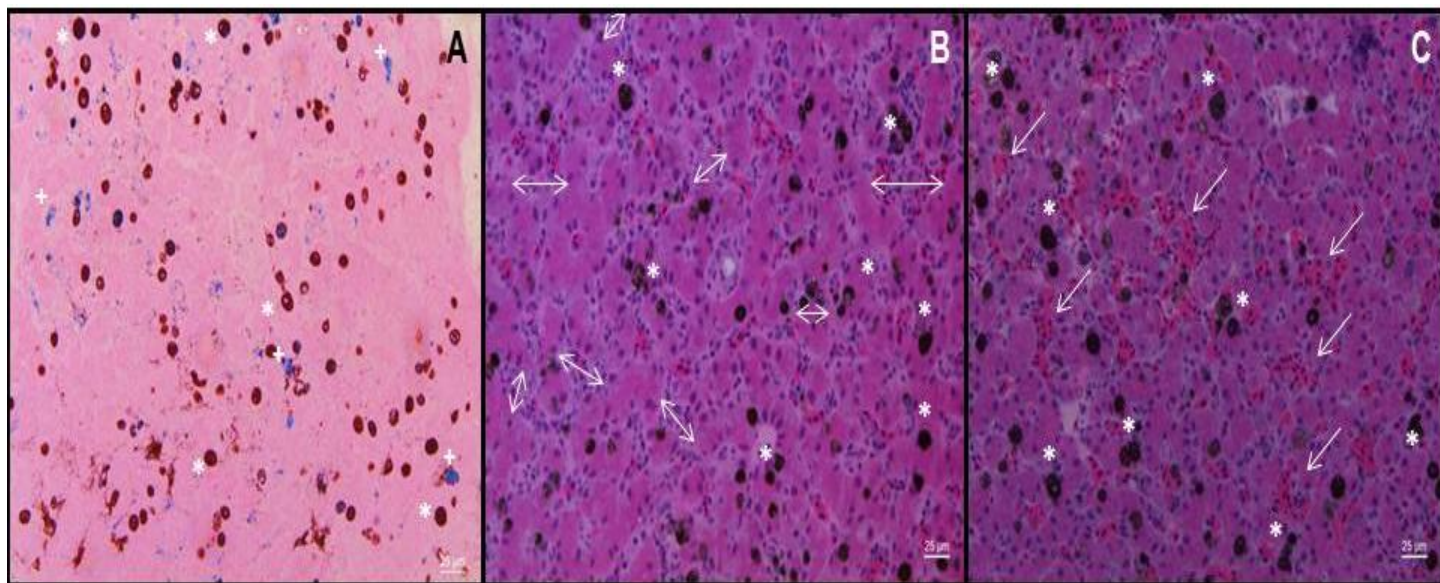


Figura 36. Histología hepática de adultos de *L. latinasus* en el grupo control (A) y tratados a 10 mg/l de IMZT (B y C) luego de 96h del pulso agudo. La doble flecha indica la patología hepática reconocida como el aumento de tamaño de los sinusoides hepáticos (B) y la flecha indica zonas de hipervascularización (C), * indica la presencia de agrupaciones de melanina, + indica la presencia de hemosiderina (A) en MMC hepáticos de adultos de *L. latinasus*.

4.4.4.2 Patologías hepáticas

Los análisis histopatológicos del hígado revelaron que IMZT produce HV y AS (Figura 36 B, C) en el escenario de mayor concentración de exposición al pulso agudo en ambos tiempos de exposición evaluados respecto del grupo control (Figura 36A). En particular, los análisis estadísticos demostraron un aumento significativo de ambas tanto a las 48 como a las 96 h en S3 ($p < 0,05$) (Tabla 13).

4.4.5. Efectos a nivel de organismo

Los bioensayos de toxicidad aguda en larvas y adultos de *L. latinasus* revelaron que IMZT induce efectos subletales a nivel de organismo. Específicamente, los resultados de dichos los efectos subletales en adultos de la especie se resumen en la tabla 13. A continuación se detallan los efectos subletales individuales evaluados para distintos puntos finales en larvas y adultos de *L. latinasus* luego de la exposición a IMZT:

4.4.5.1 Efectos subletales en el comportamiento

Larvas

Los resultados revelaron que hubo alteraciones en la actividad natatoria visualizada por presencia de larvas GS25 que manifestaron IS luego de la exposición a IMZT respecto del grupo control, tanto a las 24 como a las 48 h ($p < 0,05$), pero dichas alteraciones no fueron evidenciadas en los tratamientos superiores a las 48 h ($p > 0,05$). Los valores de NOEC y LOEC obtenidos para GS25 fueron 0,19 y 0,40 mg/l de IMZT y 0,40 y 0,81 mg/l de IMZT para 24 y 48 h, respectivamente. Por otra parte, en las larvas GS36, se observó IS a partir desde las 24 h hasta las 96 h de exposición a IMZT ($p < 0,05$). En este estadio de desarrollo, los valores NOEC y LOEC de IS obtenidos para todos los tiempos evaluados fueron 1,63 y 3,25 mg/l de IMZT, respectivamente. El análisis de regresión demostró que la respuesta de IS estuvo afectada significativamente por la concentración de IMZT en larvas GS25 de *L. latinasus* ($r = 0,87$; $p < 0,01$). Por otra parte, en larvas en GS36 el análisis de regresión demostró que la respuesta de IS varió significativamente conforme aumentaba la concentración de IMZT luego de las 24 ($r = 0,91$; $p < 0,001$) y 48 h ($r = 0,76$; $p < 0,01$) de exposición.

Adultos

Por otro lado, en adultos de *L. latinasus* no se observaron efectos en el comportamiento por la exposición a IMZT en los dos escenarios de exposición considerados (S1 y S3).

4.4.5.2 Efectos subletales en el crecimiento, desarrollo e índices de condición corporal

Larvas

Al evaluar este punto final en los bioensayos de toxicidad aguda no se detectaron alteraciones en el crecimiento y el desarrollo para ambos estadios por el tratamiento con IMZT respecto del grupo control ($p > 0,05$).

Adultos

Al evaluar el índice K, gonadosomático y de cuerpos grasos en adultos de *L. latinasus* no detectaron diferencias significativas luego de la exposición al herbicida IMZT entre las ranas expuestas en S1 y S3 con respecto al grupo control para los dos tiempos evaluados luego del pulso agudo ($p > 0,05$). No obstante, los resultados revelaron alteraciones en índice hepatosomático por exposición a IMZT en ambos escenarios (Tabla 13). Específicamente, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los escenarios de exposición con respecto al grupo control luego 48 h ($p > 0,05$), pero si se evidenció una disminución significativa del índice hepatosomático en ambos escenarios considerados para la especie luego de las 96 h ($p < 0,05$) (Tabla 13).

4.4.5.3 Efectos subletales con presencia de anomalías morfológicas

Larvas

Entre todas las anomalías morfológicas analizadas, el ANOVA demostró una disminución significativa de los queratodotes y un incremento en las anomalías corporales definida como cuerpo en forma de diamante o BDS (Peltzer y col. 2013b) - no descrita previamente por Bantle y col. (1998) - sólo en aquellas larvas GS36 expuestas a IMZT. En el análisis particular, se detectó la pérdida significativa de queratodotes luego de las 96 h pudiéndose obtener valores de NOEC y LOEC de 0,67 and 0,81 mg/l de IMZT, respectivamente ($p < 0,05$). Sumado a esto, el incremento de BDS fue evidenciado en larvas expuestas tanto a las 48 como a las 96 h, obteniéndose valores de NOEC y LOEC de 0,14 and 0,21 mg/l de IMZT, respectivamente para ambos tiempos ($p_{48h} < 0,01$; $p_{96h} < 0,001$). Finalmente, el análisis de regresión en larvas de *L. latinasus* demostró que la pérdida de queratodotes ($r = 0,38$; $p < 0,05$) y BDS ($r = 0,67$; $p < 0,01$) variaron positivamente en función de la concentración del herbicida evaluado sólo a las 48 h.

Adultos

En tanto, cuando este punto final individual fue evaluado en adultos, no se detectaron nuevas anomalías ni aumento en la frecuencia de las mismas por la exposición al formulado de IMZT respecto de las ranas del control negativo ($p > 0,05$).

4.5 Correlación de biomarcadores a diferentes niveles

En una primera instancia, con un objetivo exploratorio, se realizó un PCA con todos los puntos finales evaluados que previo al análisis fueron estandarizados. En una segunda etapa, se decidió seleccionar del conjunto de variables, sólo aquellas que mostraban significancia ($p < 0,05$) respecto de los grupos control luego del ANOVA y test de Dunnett en ambos tiempos de exposición evaluados y dichas variables fueron denominadas biomarcadores.

4.5.1 Correlación de biomarcadores en *Boana pulchella*

4.5.1.1 Análisis multivariado de los biomarcadores en larvas de *Boana pulchella*

Los análisis obtenidos de la reducción de dimensionalidades mediante el PCA revelaron un gradiente de concentraciones subletales crecientes de IMZT explicado por la correlación y respuesta integral entre los biomarcadores utilizados luego de 48 y 96 h (Figura 37). Específicamente, cuando se analizó la correlación por el PCA a las 48 h, la respuesta de los 6 biomarcadores (IS, CAT, AChE, MNs, Buds e IDG) en los diferentes niveles de organización (individual, bioquímico y citogenético) demostró que éstos se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 85,56 % (PC1 = 47,70%, PC2 = 29,18% y PC3 = 8,68%) de la variabilidad de los datos. Sumado a esto, el gradiente de concentraciones subletales se obtuvo por la respuesta integral de los biomarcadores evaluados en este trabajo, lo cual demostró que dichas respuestas varían desde las bajas concentraciones 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT a una concentración subletal elevada correspondiente a 1,17 mg/l de IMZT. Esta separación evidente entre las concentraciones se debió a la respuesta en bajas concentraciones de IDG (0,39 mg/l de IMZT) y MNs, Buds y CAT (0,78 mg/l de IMZT) mientras que en la mayor concentración subletal quedó explicada la variación por la respuesta de AChE e IS luego de 48 h de exposición a IMZT. A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas entre los biomarcadores a nivel individual (IS) y la mortalidad ($r = 0,56$; $p < 0,05$) y entre los biomarcadores citogenéticos tales como Buds y MNs ($r = 0,66$; $p < 0,05$). Por otro lado, también se detectaron correlaciones negativas significativas entre Buds y MNs (biomarcadores citogenéticos) y la respuesta de AChE (biomarcador bioquímico) ($r = -0,83$; $p < 0,05$). En concordancia con los resultados descriptivos previamente mencionados, los análisis probabilísticos utilizando las coordenadas de los casos por punto experimental demostró que la exposición a IMZT luego de 48 h produce una diferenciación significativa en la respuesta integral de los biomarcadores evidenciado porque el PC1 que permitió separar a las larvas tratadas a 1,17 mg/l de IMZT del resto de los tratamientos ($p < 0,05$) y en especial del control negativo ($p < 0,001$). Por otro lado, el PC2 permitió separar a las larvas tratadas con 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT ($p < 0,05$) del control negativo ($p < 0,01$), lo cual genera un gradiente creciente de concentraciones subletales.

Por otra parte, la correlación por el PCA, a partir de la respuesta de los 9 biomarcadores (queratodonte, MMC, GST, CAT, AChE, MN, NT, Buds e IDG) en los diferentes niveles de organización (individual, histológico, bioquímico y citogenético) a las 96 h, demostró que éstos se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 81,73 % (PC1 = 41,23%, PC2 = 26,45% y PC3 = 14,05%) de la variabilidad de los datos. Del mismo modo que a las 48 h, debido a la respuesta exhibida de los biomarcadores aquí evaluados fue posible determinar un gradiente de concentraciones subletales que varía desde las bajas concentraciones 0,39 y 0,78 mg/l de IMZT hasta la mayor concentración subletal evaluada correspondiente a 1,17 mg/l de IMZT (Figura 37). Esta separación entre las concentraciones subletales se debió a la respuesta en la mayor concentración (1,17 mg/l de IMZT) de los biomarcadores bioquímicos (CAT y AChE) y citogenéticos (HNS e IDG). Sumado a esto, el control negativo se diferenció de los grupos expuestos a IMZT por la respuesta contrapuesta de los biomarcadores citogenéticos (MNs y Buds) respecto de los biomarcadores bioquímicos (GST), histológicos (MMC) y de individuo (anormalidad en queratodonte) (Figura 37). A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos tales como IDG y GST ($r = 0,74$; $p < 0,05$) y CAT y NTs ($r = 0,64$; $p < 0,05$). Los resultados exploratorios de la estadística descriptiva multivariada fueron corroborados por los análisis de ANOVA realizados en el CP1 y CP2 utilizando las coordenadas de los factores para cada caso. Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores a cada concentración que permite separar al grupo control negativo de los tratamientos de IMZT que se encuentran gradiente creciente de concentraciones explicado principalmente PC1 para todas las concentraciones subletales evaluadas ($p < 0,001$) y en menor medida por el PC2 para las larvas tratadas con 1,17 mg/l de IMZT ($p < 0,05$).

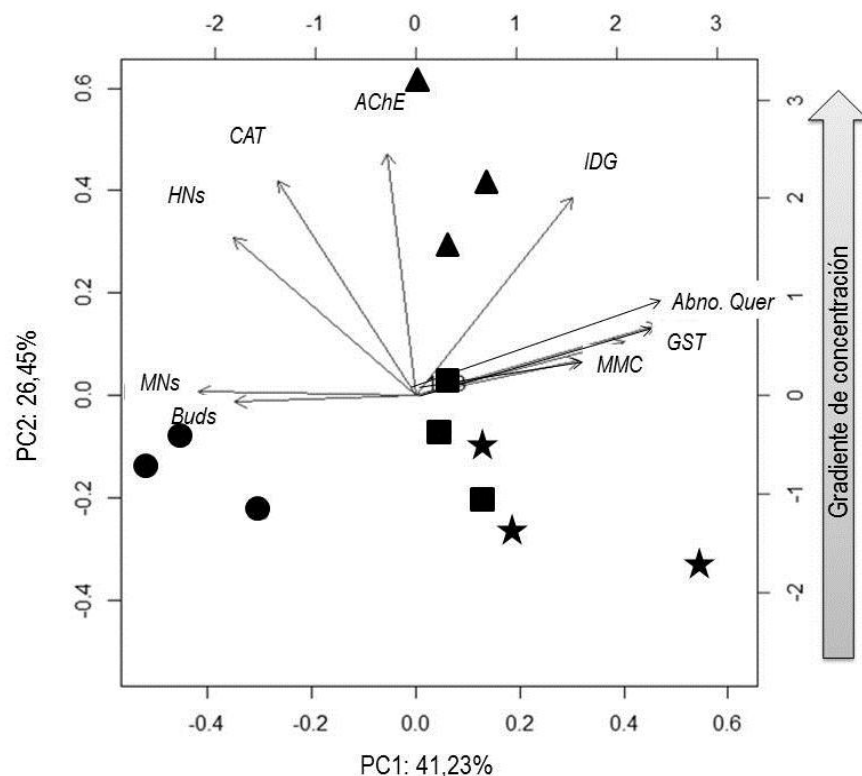


Figura 37. Biplot representando las respuestas de cada biomarcador evaluado para cada concentración subletal de exposición a IMZT en larvas de *B. pulchella* luego de 96 h. La flecha muestra el gradiente de concentración obtenido por la correlación entre los biomarcadores para cada concentración: 0,39 mg/l de IMZT (estrellas), 0,71 mg/l de IMZT (cuadrados) y 1,17 mg/l de IMZT (triángulos); respecto del control negativo (círculos). Abnor. Quer.: anomalías en los queratodotes.

En resumen, estos análisis multivariados en larvas de *Boana pulchella* demostraron correlaciones entre los puntos finales bioquímicos y citogenéticos que permiten explicar las diferentes respuestas observadas para cada concentración subletal evaluada debiendo utilizar diferentes biomarcadores según la concentración a la que se encuentren expuestas las larvas. A su vez, el análisis permitió reconocer que sólo a partir de la mayor concentración subletal ensayada se comienzan a observar las respuestas de los biomarcadores histológicos y de nivel de individuo.

4.5.1.2 Análisis multivariado de los biomarcadores en adultos de *Boana pulchella*

Los análisis obtenidos de la reducción de dimensionalidades mediante el PCA revelaron una evidente separación entre los grupos tratados con IMZT en distintos escenarios y el control negativo, la cual queda explicada por la correlación y respuesta integral entre los biomarcadores utilizados luego de 48 y 96 h (Figura 38). Específicamente, cuando se analizó la respuesta de los 6 biomarcadores (IS, CAT, AChE, MNs, Buds e IDG) en los diferentes niveles de organización

(individual, bioquímico y citogenético) y su correlación por el PCA a las 48 h, los análisis mostraron que los biomarcadores se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 67,93% ($PC1 = 33,30\%$, $PC2 = 18,58\%$ y $PC3 = 16,05\%$) de la variabilidad de los datos. Sumado a esto, a partir de la respuesta exhibida de los biomarcadores fue posible determinar dos grandes subgrupos caracterizados uno por el control negativo y otro que contenía todos los escenarios de exposición a IMZT (S1, S2 y S3) (Figura 38A). Específicamente, la separación del grupo control respecto de S1, S2 y S3 se debió en mayor medida a la respuesta de los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos que aportan a la variabilidad de $PC1$ (Figura 38A). A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas significativas entre IDG y K ($r = 0,38$; $p < 0,05$) y entre ambos biomarcadores bioquímicos, CAT y GST ($r = 0,38$; $p < 0,05$). Sumado a esto, la separación de los subgrupos se corroboró significativamente al realizar el ANOVA a partir de las coordenadas de los factores para los casos que definen el $PC1$ ($p < 0,001$). Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores que explican el $PC1$ y permiten separar al grupo control negativo de los escenarios de todos exposición a IMZT tal como S1, S2 y S3 ($p < 0,001$; para todos los casos).

Por otra parte, la correlación obtenida por el PCA, de los 3 biomarcadores (GST, MNs e IDG) que respondieron luego de las 96 h al pulso agudo de IMZT en los diferentes niveles de organización (bioquímico y citogenético), demostró que éstos se organizan en 2 componentes principales que permiten explicar el 82,73 % ($PC1 = 49,43\%$ y $PC2 = 33,30\%$) de la variabilidad de los datos. Del mismo modo que a las 48 h, debido a la respuesta exhibida de los biomarcadores aquí evaluados fue posible determinar dos grandes subgrupos caracterizados por el control negativo y los escenarios de mayor exposición a IMZT (S2 y S3) (Figura 38B). Específicamente, la separación del grupo control respecto de S2 y S3 se debió en gran medida por la respuesta de los MNs (que separa los subgrupos en el eje de $PC1$) y GST e IDG (que separa los subgrupos en el eje del $PC2$) (Figura 38B). A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos tales como IDG y GST ($r = 0,48$; $p < 0,05$). Sumado a esto, la separación de los subgrupos se corroboró significativamente al realizar el ANOVA a partir de las coordenadas de los factores para los casos que definen el $PC2$ ($p < 0,05$). Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores que explican el $PC2$ (GST e IDG) y que permiten separar al grupo control negativo de los escenarios de mayor exposición a IMZT tal como S2 ($p < 0,01$) y S3 ($p < 0,05$).

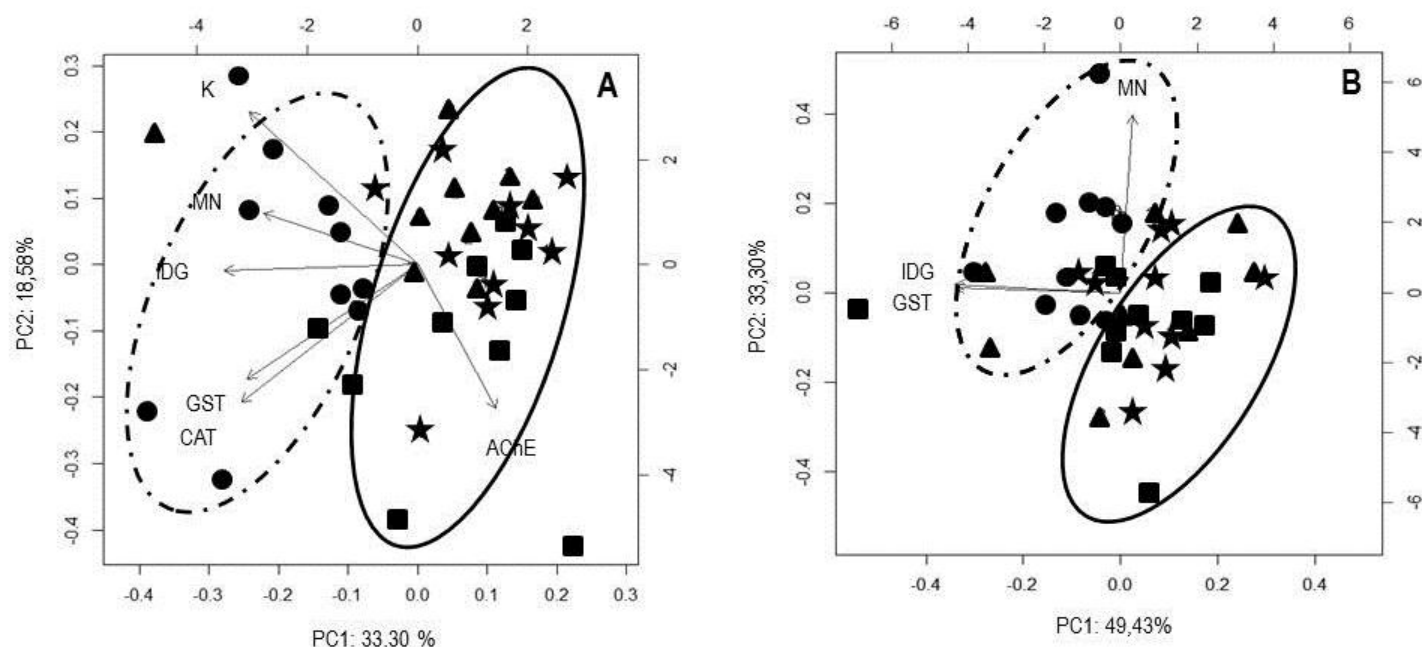


Figura 38. Biplot representando las respuestas de cada biomarcador evaluado para cada concentración subletal de exposición a IMZT en adultos de *B. pulchella* luego de 48 (A) y 96 h (B). Los círculos representan los conjuntos de subgrupos obtenidos por la correlación entre los biomarcadores para cada escenario de exposición considerado: S1 (estrellas), S2, (cuadrados) y S3 (triángulos) y el grupo control (círculos).

En resumen, el análisis multivariado permitió reconocer que en ambos tiempos de exposición las diferencias entre el grupo control y los expuestos a IMZT se deben principalmente a las respuestas determinadas por los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos.

4.5.2. Correlación de biomarcadores en *Leptodactylus latinasus*

4.5.2.1 Análisis multivariado de los biomarcadores en larvas de *Leptodactylus latinasus*

Los análisis obtenidos de la reducción de dimensionalidades mediante el PCA revelaron un gradiente de concentraciones subletales crecientes de IMZT explicado por la correlación y respuesta integral entre los biomarcadores utilizados luego de 48 y 96 h (Figura 39). Específicamente, cuando se analizó por el PCA la correlación por la respuesta de 7 biomarcadores (IS, BDS, GST, HNs, Buds, MNs e IDG) luego de la exposición a IMZT a las 48 h en los diferentes niveles de organización (de individuo, bioquímico y citogenético), este análisis demostró que los biomarcadores se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 78,40% (PC1 = 53,10%, PC2 = 13,50% y PC3 = 11,80%) de la variabilidad de los datos. Sumado a esto, de la reducción en las dimensiones obtenidas de los biomarcadores analizados mediante el PCA se generó un gradiente de concentraciones subletales en un espacio de dos dimensiones que permitió separar las bajas concentraciones subletales evaluadas tales como 0,07 y 0,15 mg/l de IMZT de la mayor concentración

subletal evaluada correspondiente a 0,21 mg/l de IMZT. La evidente separación entre las menores concentraciones subletales respecto de la mayor concentración subletal quedó explicada por la respuesta en las bajas concentraciones de los biomarcadores a nivel de individuo (BDS), bioquímicos (GST) y citogenéticos (HNs, Buds, MNs e IDG) en eje dimensional del PC1. Particularmente, la actividad de GST mostró correlacionarse negativamente y de modo significativo con los biomarcadores citogenéticos ($r = -0,33$ y $-0,42$; $p < 0,05$) e individuales ($r = -0,42$; $p < 0,05$). Por otro lado, también se detectaron correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores HNs, Buds y MNs (citogenéticos) y el biomarcador individual denominado BDS ($r_{\text{HNs}} = -0,83$, $r_{\text{buds}} = -0,70$, $r_{\text{MNs}} = -0,69$; $p < 0,05$). En concordancia con los resultados descriptivos previamente mencionados, el ANOVA utilizando las coordenadas de los casos por punto experimental demostró que luego de 48 h la exposición a IMZT produce una diferenciación significativa explicada en la respuesta integral de los biomarcadores, situación que produce la separación de las larvas tratadas con 0,07 ($p < 0,05$) y 0,15 mg/l de IMZT ($p < 0,001$) de las larvas del control negativo en un gradiente creciente de concentraciones subletales.

Por otra parte, la correlación por el PCA, a partir de la respuesta de los 8 biomarcadores (queratodonte, BDS, GST, NLs, EPs, MNs, Buds e IDG) en los diferentes niveles de organización (individuales, histológico, bioquímico y citogenético) a las 96 h, demostró que éstos se organizan en 2 componentes principales que permiten explicar el 77,60 % (PC1 = 45,60% y PC2 = 32,00%) de la variabilidad de los datos. Del mismo modo que a las 48 h, a partir de la respuesta obtenida de los biomarcadores aquí evaluados fue posible determinar un gradiente de concentraciones subletales que varía desde las bajas concentraciones 0,07 y 0,15 mg/l de IMZT hasta la mayor concentración subletal evaluada correspondiente a 0,21 mg/l de IMZT (Figura 39). El aporte de los biomarcadores individuales (queratodonte y BDS) y citogenéticos (NLs, Buds y MNs) permitió separar en el PC1 a la mayor concentración subletal evaluada (0,21 mg/l de IMZT) del resto de las concentraciones y el grupo control. Así mismo, el aporte del biomarcador bioquímico (GST) y citogenéticos (EPs e IDG) permitieron separar a la concentración subletal media (0,15 mg/l de IMZT) y baja (0,07 mg/l de IMZT) respecto del grupo control negativo en el eje dimensional del PC2 (Figura 39). En particular, los resultados del análisis multivariado mostraron que en la menor concentración subletal (0,07 mg/l de IMZT), la respuesta está dada por el biomarcador IDG, en la concentración subletal intermedia la separación respecto de las otras concentraciones en el gradiente queda explicada por la respuesta de los biomarcadores GST y EPs los cuales se encuentran correlacionados negativamente ($r = -0,73$; $p < 0,05$), mientras que en la mayor concentración evaluada (0,21 mg/l de IMZT) la separación del resto de las concentraciones se debe a los biomarcadores bioquímicos y de individuo previamente mencionados, que a su vez se encuentran positivamente correlacionados ($r = 0,58$ a $0,68$; $p < 0,05$) (Figura 39). Finalmente, la formación de un gradiente de concentraciones subletales fue corroborada significativamente por el ANOVA a partir de las coordenadas de los factores para los casos que definen CP1 y CP2 ($p < 0,001$; para ambos casos). Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores que aportan la variabilidad del

PC1 ya que permiten separar al grupo control negativo de las mayores concentraciones de IMZT evaluadas tal como 0,15 ($p < 0,05$) y 0,21 mg/l de IMZT ($p < 0,001$). Por otra parte, a partir de los biomarcadores que explican el eje dimensional del PC2 se detectaron diferencias significativas en 0,07 ($p < 0,01$) y 0,15 mg/l de IMZT ($p < 0,001$), respecto del control negativo.

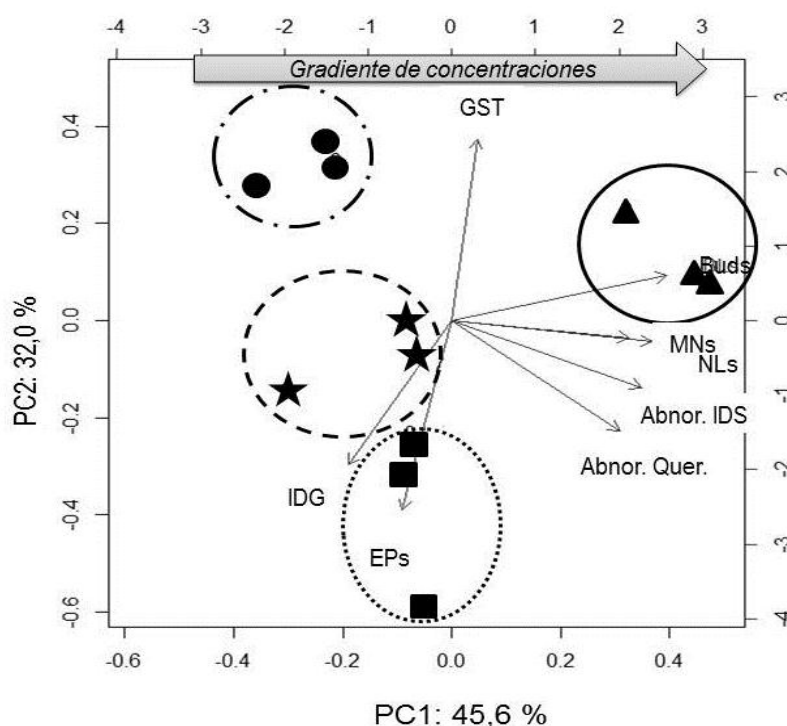


Figura 39. Biplot representando las respuestas de cada biomarcador evaluado para cada concentración subletal de exposición a IMZT en larvas de *B. pulchella* luego de 96 h. La flecha muestra el gradiente de concentración obtenido por la correlación entre los biomarcadores para cada concentración: 0,07 mg/l de IMZT (estrellas), 0,15 mg/l de IMZT (cuadrados) y 0,22 mg/l de IMZT (triángulos); respecto del control negativo (círculos). Abnor. Quer.: anomalías en los queratodotes, Abnor. IDS: anomalías BDS.

En resumen, por el PCA, se evidenció una progresión de efectos en un gradiente creciente de concentraciones subletales para los dos tiempos evaluados determinado por la respuesta de los biomarcadores desde los menores niveles de organización biológica hacia los niveles más complejos: respuesta a nivel del ADN < respuesta bioquímica < respuesta individual-citogenética.

4.5.2.2 Análisis multivariado de los biomarcadores en adultos de *Leptodactylus latinasus*

Los análisis obtenidos de la reducción de dimensionalidades en adultos de *L. latinasus* mediante el PCA revelaron una evidente separación entre los grupos tratados con IMZT en distintos escenarios y el control negativo, la cual queda

explicada por la correlación y respuesta integral entre los biomarcadores utilizados luego de 48 y 96 h (Figura 40). Específicamente, cuando se analizó la respuesta de los 4 biomarcadores (HV, AS, GST y AChE) en los diferentes niveles de organización (histológico y bioquímico) y su correlación por el PCA a las 48 h, los análisis mostraron que los biomarcadores se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 86,71% ($PC1 = 47,58\%$ y $PC2 = 39,13\%$) de la variabilidad de los datos. Sumado a esto, a partir la respuesta exhibida de los biomarcadores aquí evaluados fue posible determinar un gradiente creciente de concentraciones entre los escenarios del pulso agudo a IMZT (S1 y S3) respecto del control negativo (Figura 40A). Específicamente, la separación del grupo control respecto de S1 y S3 se debió en mayor medida por la respuesta de los biomarcadores bioquímicos que aportan a la variabilidad de PC1 y los biomarcadores histológicos que aportaron variabilidad al eje del PC2 (Figura 40A). A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores histológicos entre sí ($r = 0,52$; $p < 0,05$) y entre ambos biomarcadores bioquímicos, AChE y GST ($r = 0,88$; $p < 0,05$). Asimismo, la separación de los escenarios en un gradiente creciente de concentraciones se corroboró significativamente al realizar el ANOVA a partir de las coordenadas de los factores para los casos que definen el PC1 ($p < 0,05$) y PC2 ($p < 0,001$). Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores que explican el PC1 dado que permiten separar al grupo control negativo del escenario de exposición S3 ($p < 0,05$), así como los biomarcadores que aportan al eje del PC2 que permiten separar al grupo control de S1 ($p < 0,05$) y S3 ($p < 0,001$).

Por otra parte, la correlación obtenida por el PCA, de los 7 biomarcadores (IHS, AS, HV, Melanina, Hemosiderina, CAT y MN) que respondieron luego de las 96 h al pulso agudo de IMZT en los diferentes niveles de organización (individual, histológico, bioquímico y citogenético), demostró que éstos se organizan en 3 componentes principales que permiten explicar el 63,77 % ($PC1 = 29,55\%$, $PC2 = 20,29\%$ y $PC3 = 13,93\%$) de la variabilidad de los datos. En este caso, debido a la respuesta exhibida de los biomarcadores aquí evaluados fue posible determinar dos grandes subgrupos caracterizados por el control negativo y el escenario de mayor exposición a IMZT (S3) (Figura 40B). Específicamente, la separación del grupo control respecto de S3 se debió en gran medida por la respuesta de los MNs, melanina de los MMC, AS y HV (que separan los subgrupos en el eje de PC1) y el IHS, CAT y hemosiderina en MMC (que separan los subgrupos en el eje del PC2) (Figura 40B). A partir de estos análisis, también fue posible evidenciar correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores histológicos tales como AS y HV ($r = 0,39$; $p < 0,05$) así como correlaciones negativas significativas entre MNs y AS ($r = -0,40$; $p < 0,05$). Sumado a esto, la separación de los subgrupos se corroboró significativamente al realizar el ANOVA a partir de las coordenadas de los factores para los casos que definen el PC1 y PC2 ($p < 0,05$). Específicamente, los análisis revelaron que luego de 96 h hay una diferenciación significativa en la respuesta de los biomarcadores que explican el PC1 (MNs, melanina de los MMC, AS y HV) así como los que definen el

PC2 (BDS, CAT y hemosiderina en MMC) que permiten separar al grupo control negativo del escenario mayor exposición a IMZT evaluado denominado S3 ($p_{PC1} < 0,05$; $p_{PC2} < 0,05$).

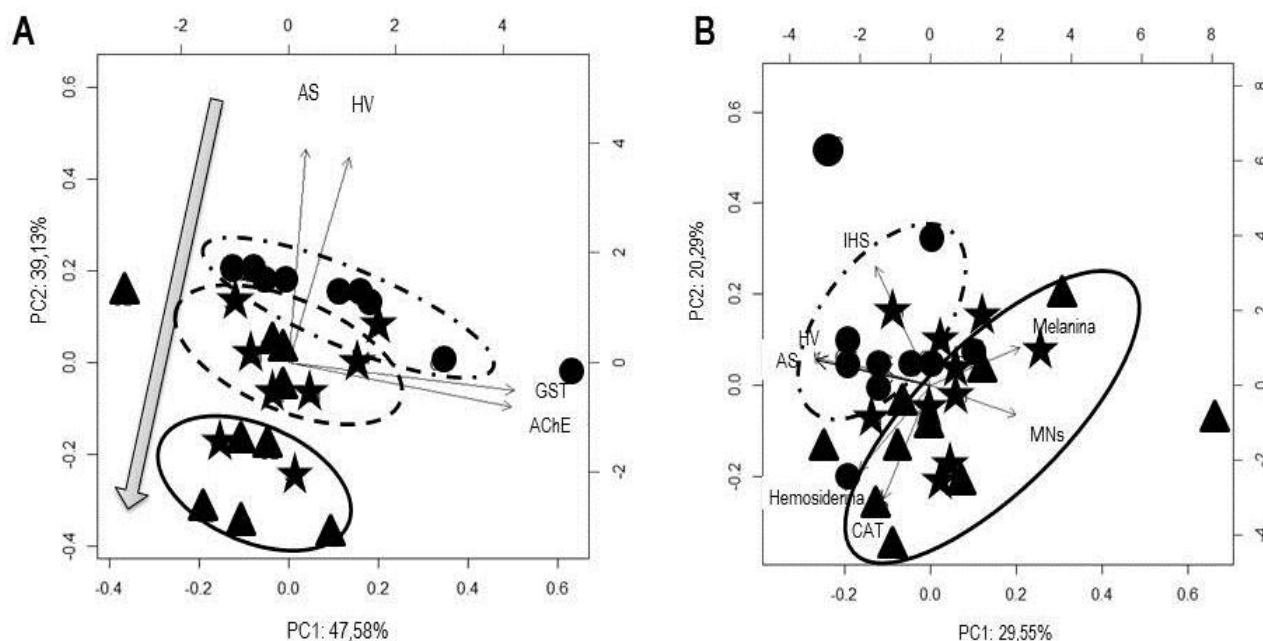


Figura 40. Biplot representando las respuestas de cada biomarcador evaluado para cada concentración subletal de exposición a IMZT en adultos de *L. latinasus* luego de 48 (A) y 96 h (B). La flecha muestra el gradiente de concentración obtenido por la correlación entre los biomarcadores para escenario de exposición considerado: S1 (estrellas), S2, (cuadrados) y S3 (triángulos), respecto del grupo control (círculos).

En resumen, el análisis multivariado permitió reconocer que las diferencias entre el grupo control y los expuestos a IMZT se deben principalmente a las respuestas determinadas por los biomarcadores bioquímicos e histológicos a las 48 h y por los biomarcadores del nivel individual, histológicos, bioquímicos y citogenéticos luego de 96 h de la exposición al pulso agudo.

4.6 Comparación de las respuestas entre especies

4.6.1 Comparación de la sensibilidad entre las especies modelo utilizadas según los biomarcadores empleados

Los resultados de los análisis al comparar entre ambas especies estudiadas todos los puntos finales letales evaluados y los biomarcadores, revelaron diferencias significativas en la respuesta a IMZT tanto en larvas como en adultos para ambos tiempos de exposición evaluados (48 y 96 h).

En particular, los análisis estadísticos del t-test pareado realizados en larvas revelaron diferencias significativas entre especies en su respuesta a IMZT ($p < 0,01$) al analizar los puntos finales letales tales como CL50 y valores LOEC

entre ambas especies y para ambos estadios de desarrollo (GS25 y GS36) para ambos tiempos de exposición. Por otro lado, cuando este análisis estadístico se llevó a cabo evaluando los biomarcadores que en su conjunto respondieron a IMZT en larvas, los resultados no demostraron diferencias significativas en la respuesta a IMZT entre especies para ambos tiempos de exposición considerados ($p > 0,05$). No obstante, cuando se analizó la respuesta de cada biomarcador por separado según el nivel de organización en que se encontraban, los análisis revelaron diferencias significativas en los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos entre las especies en su respuesta a IMZT a las 48 y 96 h ($p < 0,05$) pero no hubieron diferencias significativas en las respuestas de los biomarcadores del nivel de individuo en esos tiempos de exposición ($p > 0,05$).

Por otra parte, los resultados en adultos revelaron diferencias significativas entre las especies cuando se compararon las respuestas de todos los biomarcadores analizados (nivel organismo, bioquímico y citogenético) y en ambos tiempos evaluados luego del pulso agudo de exposición a IMZT ($p < 0,05$).

4.6.2 Curva SSD y evaluación de riesgo toxicológico en anuros de ambientes pampeanos

A partir de los valores de CL50 obtenidos de los bioensayos de toxicidad utilizando larvas GS25 de otras 7 especies pampeanas tales como *C. ornata*, *Dendropsophus* sp., *L. latrans*, *P. falcipes*, *R. arenarum*, *R. fernandezae* y *S. squalirostris* se construyó la curva SSD para IMZT en especies de anuros pampeanas (Figura 41). Específicamente, los valores de CL50 obtenidos para las otras especies fueron *C. ornata* CL50 = 1,01 mg/l de IMZT; *Dendropsophus* sp. CL50 = 0,68 mg/l de IMZT; *L. latrans* CL50 = 1,07 mg/l de IMZT; *P. falcipes* CL50 = 0,78 mg/l de IMZT; *R. arenarum* CL50 = 0,70 mg/l de IMZT; *R. fernandezae* CL50 = 1,16 mg/l de IMZT; y *S. squalirostris* CL50 = 0,50 mg/l de IMZT. Analizando la curva SSD (Figura 41) se puede constatar que *B. pulchella* ocupa el último cuartil correspondiente al 75%-100% siendo la especie menos sensible a IMZT comparada con el resto de las especies pampeanas. Por otro lado, *L. latinasus* se encuentra ocupando en el tercer cuartil correspondiente al 50-75% dentro de la curva SSD lo que indica una sensibilidad media a IMZT respecto del resto de las especies pampeanas (Figura 41). No obstante, se constató por los resultados de la curva SSD que *L. latinasus* resultó más sensible a IMZT que *B. pulchella*. Sumando a esto, a partir de estos resultados fue posible obtener un valor de HC5 equivalente a 0,53 mg/l de IMZT para las especies pampeanas y este valor podría indicar un riesgo para los ecosistemas acuáticos donde las larvas de anuros pampeanos habitan si consideramos los valores de CL50 (0,50 – 1,48 mg/l de IMZT) obtenidos para cada especie así como los efectos subletales observados a bajas concentraciones en *B. pulchella* (0,39 a 1,17 mg/l de IMZT) y *L. latinasus* (0,07 a 0,22 mg/l de IMZT).

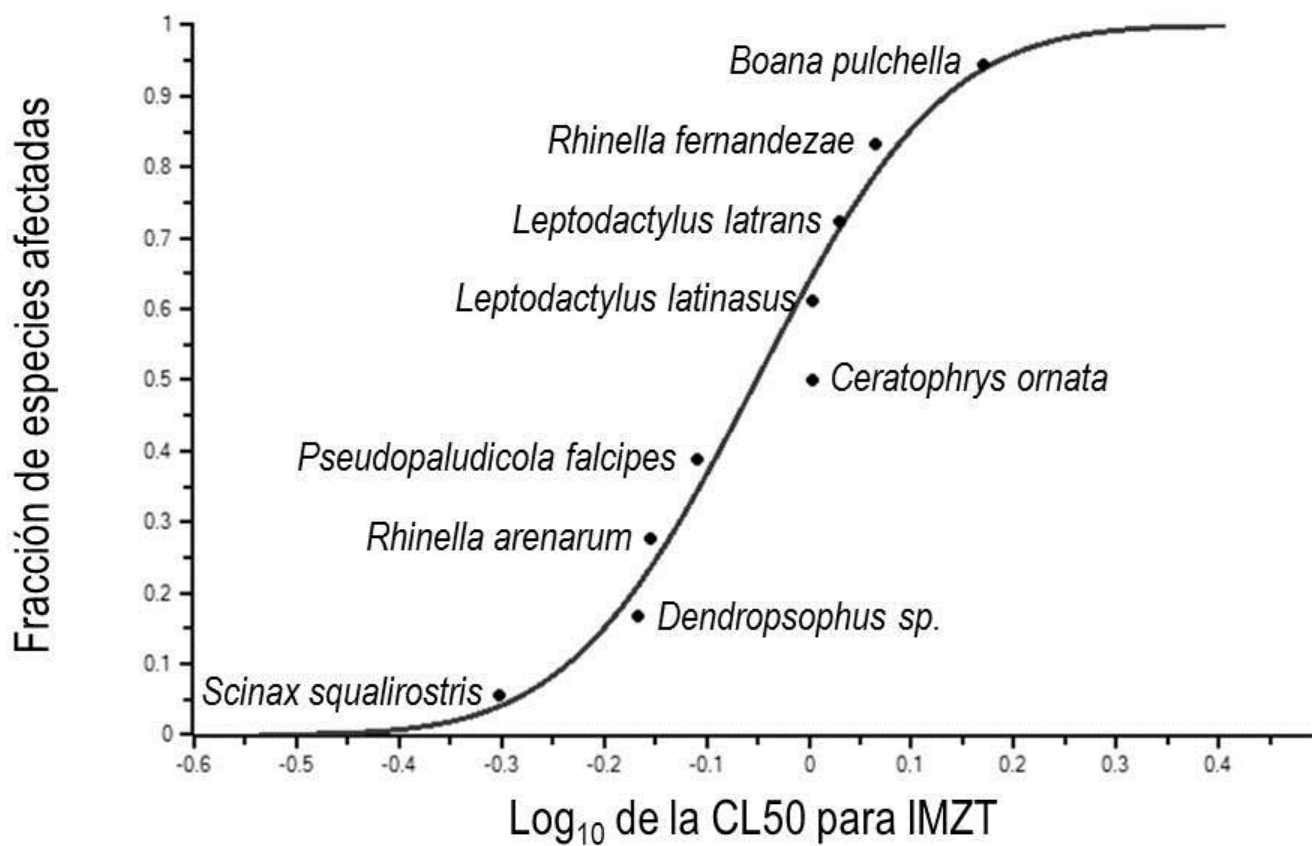


Figura 41. Curva de sensibilidad de especies (SSD) en anuros pampeanos basada en los valores de CL50 obtenidos luego de la exposición a IMZT. La curva SSD representa la predicción de toxicidad (línea de tendencia central) con las diferentes especies de anuros pampeanos indicadas con los puntos.

CAPITULO V: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. Discusión

5.1.1 Sobre la utilidad de la especie como modelo de estudio

Los datos obtenidos de los muestreos y la cría en cautiverio de las especies estudiadas permiten afirmar que las mismas poseen ciertas ventajas generales para ser utilizadas como modelos de estudio tales como su abundancia, diversidad de ambientes que habitan, época del año en que están presentes durante todo su ciclo de vida o la posibilidad de extracción de muestras en las diferentes etapas de su ciclo biológico para evaluar los diferentes puntos finales, entre otras. Por otra parte, también presentan ciertas desventajas generales como el pequeño tamaño corporal que imposibilita la toma de muestras biológicas sin el sacrificio del animal, la dificultad de reproducción en cautiverio o la escasez de estudios ecotoxicológicos previos. No obstante, a partir de los nuevos datos aportados por la presente tesis doctoral y tomando en consideración estudios previos, consideramos que tanto *B. pulchella* como *L. latinasus* en diferentes etapas de su ciclo de vida son importantes especies modelo para ser utilizadas en futuros estudios ecotoxicológicos.

En particular, es importante *B. pulchella* sea considerada como especie modelo de ambientes pampeanos para estudios ecotoxicológicos que evalúen las problemáticas en dichos ambientes. A pesar de que la especie posee ciertas desventajas como presentar un pequeño tamaño (es necesario sacrificar el animal para realizar los estudios a diferentes niveles), poseer larvas y adultos en dos diferentes épocas del año (motivo por el cual puede exhibir diferencias en la sensibilidad a un estresor) (Da Rosa y col. 2011), tener un ciclo larval extenso y que hasta el momento no se logró la reproducción *ex situ*; la especie tiene variadas características que permiten que sea útil como especie modelo en estudios toxicológicos. Algunas de estas características ventajosas son:

- ✓ posee un número elevado de huevos (Natale et al. 2006),
- ✓ sus poblaciones actualmente no están en riesgo (Vaira y col. 2012; IUCN 2017),
- ✓ no presentan dificultades para la cría y mantenimiento en laboratorio tanto en la fase larval como adulta (Kehr 1987, Kehr 1989, Ziegler y col. 2013),
- ✓ es una especie disponible y abundante durante todo el año en diferentes estadios de vida (aunque fue mencionado como una desventaja, esta característica también representa una ventaja dado que con un buen diseño experimental se puede evaluar diferencias en la susceptibilidad en sus poblaciones que podrían estar expuestas a los estresores ambientales durante todo el año en todas las etapas de su ciclo de vida) así como también en agroecosistemas (Sánchez y col. 2013, Agostini y col. 2016, Suárez y col. 2016),
- ✓ presentan respuesta en todos los puntos finales evaluados a diferentes niveles,
- ✓ en general, es posible obtener muestras biológicas para evaluar diferentes puntos finales tanto en larvas (alcanzan grandes tamaños) como adultos y

- ✓ presentan un particular modo de vida (adheridas a la vegetación) que permite evaluar una vía alternativa de exposición a plaguicidas como el efecto del rociado directo a la fauna asociada a las plantas autóctonas, ruta de exposición escasamente estudiada en anuros.

En este contexto, *B. pulchella* ha sido ampliamente empleada en estudios ecotoxicológicos frente a la acción de diversos estresores como metales pesados y plaguicidas utilizando puntos finales letales y subletales a nivel de individuo, bioquímico y citogenético (Natale y col. 2000, Lajmanovich y col. 2005, Natale y col. 2006, Agostini y col. 2009, Agostini y col. 2010, Junges y col. 2010, Peltzer y col. 2013a, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014). A pesar de esta información, hasta el momento sólo existía un reporte sobre efectos adversos de herbicidas sobre la especie (Peltzer y col. 2013) y además no se había empleado su fase adulta para estudios ecotoxicológicos en laboratorio. En este sentido, el presente trabajo de tesis aporta nueva información de base para utilizar a *B. pulchella* en futuras investigaciones.

Por otra parte, a partir de los estudios de campo y laboratorio realizados en *L. latinasus* se puede concluir que al igual que *B. pulchella*, es una especie modelo de ambientes pampeanos óptima para estudios ecotoxicológicos que evalúen las problemáticas en estos ambientes. Si bien en esta especie las desventajas son que también presenta un pequeño tamaño para la toma de muestras (es necesario sacrificar el animal para realizar los estudios a diferentes niveles), que el número de huevos es relativamente bajo en cada desova (aproximadamente $n = 400$) en comparación con el resto de las especies pampeanas, que hasta el momento no se logró la reproducción *ex situ* y que la información sobre la biología de la especie es escasa; *L. latinasus* presenta amplias ventajas como:

- ✓ ser la especie más abundante en los ambientes pampeanos y en los agroecosistemas (Sánchez y col. 2013, Maragno y col. 2013, Agostini y col. 2016, Guerra y Araoz 2016, Medina y col. 2016, Suárez y col. 2016),
- ✓ su máxima actividad en el año (noviembre a febrero) se corresponde con la época de mayor aplicación de plaguicidas en los agroecosistemas pampeanos (Agostini y col. 2016, Suárez y col. 2016),
- ✓ presentar un desarrollo larval en periodos de tiempo relativamente cortos (Basso y Kehr, 1991),
- ✓ que sus poblaciones actualmente no están en riesgo (Vaira y col. 2012, IUCN 2017),
- ✓ no presentar dificultades para la cría y mantenimiento en laboratorio tanto en la fase larval como adulta,
- ✓ en general responden en todos los puntos finales evaluados a diferentes niveles,
- ✓ es posible obtener muestras biológicas para evaluar diferentes puntos finales tanto en larvas como adultos y
- ✓ su particular modo de vida (viviendo en cuevas construidas en el suelo) permite evaluar una vía de exposición alternativa como la escorrentía superficial que no es posible evaluar en otras especies de anuros.

No obstante, a pesar de estas ventajas y de haber sido utilizada como la especie modelo en estudios sobre agroecosistemas (Sánchez y col. 2013, Maragno y col. 2013, Agostini y col. 2016, Guerra y Araoz 2016, Medina y col. 2016, Suárez y col. 2016), *L. latinasus* ha sido empleada para un único estudio ecotoxicológico en su fase adulta frente a la acción del herbicida glifosato evaluando biomarcadores histológicos (Pérez-Iglesias y col. 2016). En este sentido, la información de la presente Tesis Doctoral constituye en particular la primera evaluación ecotoxicológica en larvas de la especie y en general el primer estudio utilizando puntos finales a diversos niveles de organización biológica sobre la especie más abundante de los ambientes pampeanos y de los agroecosistemas.

5.1.2 Evaluación toxicológica de IMZT en larvas de las especies estudiadas

Los resultados obtenidos a partir de los valores de CL50 demostraron que IMZT produce efectos letales en las larvas de anuros en un intervalo de concentraciones entre 0,50 y 1,49 mg/l en 9 especies pampeanas. Considerando los valores de CL50, IMZT puede ser clasificado de moderada a elevada preocupación ecotoxicológica para larvas de anuros pampeanos según la clasificación propuesta por la U.S. EPA y ASTM (Smrček y col. 1993, Wagner y col. 1995) y como compuesto tóxico (Categoría II) a muy tóxico (Categoría I) si consideramos los criterios de la ONU (2011) y la UE (Mazzatorta y col. 2002), para las especies de anuros pampeanas estudiadas. En particular, en larvas de *B. pulchella*, reviste la categoría de moderada preocupación ecotoxicológica según U.S. EPA y ASTM (Smrček y col. 1993, Wagner y col. 1995) y queda enmarcado en la categoría de compuesto tóxico para organismos acuáticos (Categoría II) según los criterios de la ONU (2011) y la clasificación propuesta por la UE (Mazzatorta y col. 2002). En el caso de *L. latinasus* el herbicida debería ser considerado como compuesto de elevada preocupación toxicológica según U.S. EPA; mientras que sería clasificado como compuesto muy tóxico para organismos acuáticos (Categoría I) según los criterios de la ONU (2011) y la clasificación propuesta por la UE (Mazzatorta y col. 2002).

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que la CL50 para larvas de *B. pulchella* es igual a 1,55 mg/l de IMZT tanto a 24 h como a 96 h. Si consideramos los estudios ecotoxicológicos previos que han utilizado larvas de *B. pulchella* se puede observar que los valores de CL50_{96h} fueron de 29,60 mg/l luego de la exposición Cr (VI) (Natale y col. 2006), 0,47 mg/l para el insecticida cipermetrina en su forma pura o 0,175 mg/l para el formulado comercial de cipermetrina (Agostini y col. 2010) y 0,00013 mg/l para la formulación comercial de endosulfan (Agostini y col. 2009). Recientemente se determinó que para larvas de *B. pulchella* los valores de CL50_{96h} para el insecticida imidacloprid, en su forma pura y en el formulado comercial Glacoxan Imida, son equivalentes a 84,91 y 52,62 mg/l, respectivamente (Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014). Sumado a esto, se reportó un valor de CL50_{48h} de 21,47 mg/l por la exposición de larvas de la especie al herbicida glufosinato de amonio (Peltzer y col. 2013a). De acuerdo a esta información ecotoxicológica disponible, al comparar los valores de CL50, se puede determinar con suficiente evidencia que esta especie resultó

aproximadamente 11.923; 8,9 y 3,3 veces menos sensible a IMZT que a los plaguicidas endosulfan, cipermetrina en formulado comercial y cipermetrina pura, respectivamente. Por otro lado, *B. pulchella* resultó aproximadamente 17,72; 19,1; 33,9 y 54,77 veces más sensible a IMZT que a los estresores ambientales como glufosinato de amonio, Cr (VI), Glacoxan Imida e imidacloprid puro, respectivamente. Por otro lado, como fuera mencionado anteriormente, hasta el momento no existen registros en la literatura de efectos letales en larvas de *L. latinasus* por lo que este trabajo constituye el primer estudio ecotoxicológico y la primer evidencia de efectos letales en larvas de esta especie por exposición a un plaguicida.

Al comparar las dos especies utilizadas como modelo de estudio ecotoxicológico, los resultados estadísticos revelaron que *B. pulchella* resultó menos sensible que *L. latinasus* a IMZT. Posteriormente, estos resultados fueron constatados al obtener la curva SSD. Esta sensibilidad diferencial exhibida entre especies puede deberse a diferencias particulares en las tasas de desarrollo y crecimiento larval de una especie donde están implicados diferentes mecanismos bioquímicos y celulares de respuesta a estresores ambientales como los plaguicidas (Ferrari y col. 2008). A modo de ejemplo, en nuestro estudio comprobamos que cuando *B. pulchella* fue expuesta a una concentración de IMZT equivalente al 25% de la CL50_{96h} luego de 48 h respondieron los biomarcadores enzimáticos CAT (sugiriendo en este caso que esta enzima tiene un importante rol como principal vía contra el estrés oxidativo) y AChE; mientras que en *L. latinasus* fue GST el biomarcador bioquímico GST que primero respondió, en iguales condiciones de exposición. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que la diferencia intraespecífica observada en la sensibilidad a IMZT se deba a las diferentes historias de vida de cada especie y diferente adaptación a los ambientes perturbados como los agroecosistemas, como han sugerido diferentes autores como Hammond y col. (2012), Jones y col. (2009) y Suarez y col. (2016).

Por otra parte, si nos enfocamos en el análisis de la diferencia en la variación de la susceptibilidad intraespecífica entre estadios larvales de *L. latinasus*, podemos observar que el GS37 resultó significativamente más sensible que el GS25. Si bien no existe una clara explicación frente a estos resultados, cabe destacar que Harris y col. (2000) encontraron resultados similares en larvas de *Anaxyrus americanus* y *Lithobates pipiens*. En ese estudio, las larvas de las especies mencionadas fueron más sensibles en estadios de desarrollo más avanzados al ser expuestas a los insecticidas endosulfan y mancozeb. Sumado a esto, Sanders y col. (1970) encuentran resultados similares en larvas de *A. woodhousii* expuestas al insecticida DDT. En este caso, demuestran que las larvas que alcanzaban estadios de desarrollo más avanzados y cercanos a la metamorfosis eran más sensibles al plaguicida que las larvas en GS25. En este contexto, los investigadores sugieren que una posible explicación a este fenómeno puede estar relacionada con procesos fisiológicos que ocurren en estadios de desarrollo cercanos a la metamorfosis (Sanders 1970, Harris y col. 2000). Sin embargo, sería importante generar nuevas investigaciones que busquen responder estas preguntas.

Finalmente, cabe destacar que en este trabajo fue utilizado el formulado comercial Pivot® H que contiene sólo 10,59% del ingrediente activo de IMZT. Con respecto a esto, hace unas décadas la U.S. EPA (1982) remarcó que la

toxicidad aguda de un ingrediente activo puede ser diferente a la toxicidad de un formulado comercial que contiene ese ingrediente activo. En esa misma línea, diversas investigaciones en anuros han demostrado que las formulaciones comerciales pueden inducir efectos letales y subletales independientemente del ingrediente activo que las compone (Mann y Bidwell 1999, Brühl y col. 2013, Nikoloff y col. 2013, 2014b, Pérez-Iglesias y col. 2014, Ruiz de Arcaute y col. 2014, Bach y col., 2016). A pesar de esto, en el formulado comercial Pivot® H utilizado en este estudio no fue posible determinar los compuestos aditivos presentes la formulación mencionada. Esta situación particular se debe a que actualmente en nuestro país los excipientes o compuestos aditivos presentes en las formulaciones pueden mantenerse como un “secreto comercial” motivo por el cuál no es obligación que figuren en la hoja informativa (o membrete) del plaguicida. No obstante, es necesario realizar más estudios que intenten dilucidar si la elevada toxicidad detectada en este trabajo por Pivot® H en las especies estudiadas es atribuible a IMZT o la presencia de otros xenobióticos dentro de la formulación comercial.

5.1.3. Efectos de IMZT a nivel citogenético en larvas y adultos de las especies estudiadas

5.1.3.1 Efectos agudos

Los biomarcadores citogenéticos mostraron respuestas en ambos tiempos evaluados para las especies estudiadas luego de la exposición a IMZT en concentraciones subletales en larvas y en los escenarios de posible exposición en adultos.

En particular, los resultados demostraron que IMZT induce un incremento en la frecuencia de MNs a las 48 h en larvas de *B. pulchella* expuestas a la mayor concentración subletal ensayada equivalente a 1,17 mg/l de IMZT; mientras que a las 96 h IMZT indujo genotoxicidad por aumento en la frecuencia de MNs a todas las concentraciones subletales ensayadas, intervalo correspondiente a 0,39 hasta 1,17 mg/l. De acuerdo con esto, los resultados podrían indicar que por debajo de 1,17 mg/l de IMZT el herbicida no es capaz de inducir daño genético luego de 48 h utilizando la técnica de MNs. De cualquier manera, fueron necesarios mayores tiempos de exposición a IMZT para la formación de MNs en larvas de la especie independientemente de la concentración y esta situación particular permitió que los eritrocitos circulantes alcancen la primera división celular mitótica luego de 96 h. Los resultados de este trabajo también destacan que en esta especie los valores correspondientes a la frecuencia de MNs en larvas expuestas durante 48 h a 1,17 mg/l de IMZT son mayores que los inducidos por IMZT en todas las concentraciones subletales luego de 96 h. Esta situación particular tiene una posible explicación que puede estar relacionada con que la citotoxicidad de IMZT en eritrocitos conlleva a una muerte celular selectiva inducida por el propio herbicida lo que resulta en una proporción reducida de eritrocitos capaces de alcanzar la mitosis después de las 96 h de exposición. Por otra parte, a partir de los estudios realizados fue posible corroborar que independientemente de la duración del bioensayo, la exposición aguda a IMZT en un intervalo de concentraciones entre 0,39 y 1,17 mg/l incrementa la frecuencia de lesiones primarias de ADN estimadas por el EC, resultado marcadamente

diferente a lo observado con el ensayo de MNs. Una posible explicación a esta observación puede estar relacionada con el diferente estado celular de las células diana que son consideradas para el análisis de cada biomarcador. Específicamente, el daño en el ADN en el ensayo cometa es estimado en una población celular sanguínea heterogénea mientras que para el ensayo de MNs las lesiones en el ADN son determinadas sobre eritrocitos proliferantes con lesiones que han pasado por al menos un ciclo celular mitótico por lo cual es muy probable el hecho de que la evaluación a 48 h resulte un tiempo demasiado corto para permitir la división celular de las células sanguíneas y por lo tanto detectar la manifestación del daño existente mediante esta técnica (He y col. 2000). Otro aspecto importante a remarcar es que IMZT fue capaz de inducir anormalidades nucleares además de MNs en larvas de *B. pulchella* en el intervalo de concentraciones subletales evaluadas. En este sentido, los reportes previos han demostrado que estas anormalidades nucleares como por ejemplo BNs y NLs pueden ser utilizados como buenos indicadores de daño genético (Cavaş y Ergene-Gözükara 2005, Ruiz de Arcaute y col. 2014) y en ese caso nuestros resultados soportan esa idea a partir de los efectos observados.

En el caso de la exposición de IMZT en adultos de *B. pulchella*, los resultados demostraron que la exposición en los diferentes escenarios considerados puede producir daño citogenético. Específicamente, se observó un aumento de MNs y del daño en ADN para todos los posibles escenarios de exposición planteados. Siendo este el primer estudio ecotoxicológico de este tipo para la especie, es importante considerar que ambos biomarcadores citogenéticos son herramientas útiles para ser utilizadas en estudios de monitoreo ambiental en los cuales estas ranas estarían expuestas a los estresores ambientales y además que los modos de exposición considerados en este trabajo son útiles para realizar evaluaciones más realistas sobre la forma en que los plaguicidas ingresan y actúan sobre los anfibios.

En el caso de los estudios citogenéticos en larvas de *L. latinasus* los biomarcadores genéticos también mostraron respuestas luego de la exposición subletal a IMZT para ambos tiempos evaluados. Los resultados demostraron que IMZT induce un incremento significativo en la frecuencia de MNs en eritrocitos de la especie luego de 48 y 96 h en la mayor concentración subletal evaluada correspondiente a 0,22 mg/l. A su vez, el herbicida IMZT también indujo anormalidades nucleares tales como NLs, BLs, HNs y EPs en los eritrocitos de las larvas de *L. latinasus* para ambos tiempos evaluados. Estos son congruentes con los obtenidos en larvas de *B. pulchella*. El aumento significativo de EPs en larvas podría estar representando un mecanismo particular de esta especie para aumentar la eficiencia del transporte de oxígeno logrando mejorar la relación superficie / volumen celular y esta situación puede darse en condiciones de contaminación del agua por ejemplo por residuos de plaguicidas (Barni y col. 2007). Esta explicación cobra mayor relevancia si consideramos que las larvas de *L. latinasus* pueden pasar parte de su desarrollo en ambientes donde el agua tiene bajas concentraciones de oxígeno. No obstante, sería de gran importancia ecológica realizar nuevos estudios que intenten resolver los interrogantes sobre las diferentes respuestas fisiológicas a plaguicidas en especies de anuros que tienen diversos modos de vida.

Evaluando el biomarcador citogenético del EC, los estudios revelaron que independientemente de la duración del bioensayo agudo el herbicida estudiado induce un aumento significativo de las lesiones primarias en el ADN de larvas de *L. latinasus*, resultados diferentes a los observados luego del ensayo de MNs pero consistentes con lo encontrado para larvas de *B. pulchella* al analizar los mismos biomarcadores.

Respecto a los adultos de *L. latinasus*, se detectó un aumento significativo de daño citogenético en la situación propuesta de escorrentía superficial (S1) y la especie presentó efectos más severos (daños a nivel bioquímico, histológico e individual) en la peor situación de exposición considerada, la exposición directa o S3. En este caso particular, podemos entender que el biomarcador citogenético evaluado en esta oportunidad (MNs) se presenta como una señal de alerta, respondiendo en situaciones de bajas concentraciones, antes de que ocurran daños irreversibles a niveles de organización superior. Sumado a esto, si se considera el particular modo de vida de esta especie, podemos entender que los MNs en este caso serían una herramienta válida a utilizar en monitoreos con *L. latinasus* dado que un evento de escorrentía superficial es la situación de exposición más probable de ocurrir cuando se reproducen o cuando dejan sus huevos y larvas en cuevas que se inundan luego de eventos de escorrentía por intensas lluvias.

Cabe destacar que los estudios *in situ* e *in vivo* utilizando a *B. pulchella* y *L. latinasus* como especies modelo para evaluar efectos citogenéticos son escasos. En particular, Lajmanovich y col. (2005) emplearon larvas de *B. pulchella* para evaluar la inducción de MNs por el insecticida endosulfan. Posteriormente, en estudios propios evaluamos el efecto de imidacloprid en su formulación comercial y el compuesto activo utilizando ambos biomarcadores (MNs y EC) en larvas de la especie. No obstante, en adultos de *B. pulchella* aún no hay reportes de estudios experimentales empleando biomarcadores citogenéticos aunque algunos investigadores han utilizado la especie en su fase adulta para evaluar efectos citogenéticos utilizando el ensayo de MNs en individuos que habitan agroecosistemas (Brodeur y col. 2012). En el caso de *L. latinasus*, la situación es completamente diferente dado que no hay reportes en la actualidad de haber sido utilizada como especie modelo en estudios citogenéticos en su fase larval. En cuanto a la fase adulta, sólo se tiene registro de exposición experimental en esta especie al herbicida glifosato utilizando como exposición la inyección intraperitoneal y evaluando la respuesta al plaguicida mediante el ensayo de MNs (Pérez-Iglesias y col. 2016). En este sentido, el presente trabajo no sólo corrobora la utilidad de estos biomarcadores genéticos sino que además constituye el primer estudio ecotoxicológico empleando larvas de la especie evaluando la técnica del EC como biomarcador luego de una exposición experimental a un plaguicida.

De cualquier manera, se debe resaltar que IMZT produce daños citogenéticos en larvas y adultos de ambas especies. En este sentido, es importante destacar que se ha propuesto que la inestabilidad genómica juega un rol fundamental en la disminución del estado de salud o bienestar en las poblaciones de vertebrados acuáticos porque cuando ocurre un daño en el ADN, ya sea por aumento de MNs, alteraciones nucleares o daño directo en el ADN, esta situación

puede terminar con la muerte celular y conducir a situaciones fisiopatológicas severas que incrementan el estrés fisiológico (Barni y col. 2007, Çavaş y Ergene-Gözükara 2003, 2005, Jha 2008). No obstante, otro escenario puede ocurrir si las células dañadas sobreviven. En este caso, las células dañadas que no son reparadas o que han pasado por una reparación deficiente también tendrán efectos adversos inmediatos sobre el bienestar y la salud de estos organismos lo que puede finalmente resultar en disminución de la supervivencia y efectos poblacionales a largo plazo (Barni y col. 2007, Jha 2008). Por otra parte, cabe destacar que el EC se ha convertido en una valiosa herramienta como biomarcador en anfibios para evaluar directamente áreas contaminadas (ensayo *in situ*) (Burlibasa y Gavrila 2011; Maselli y col. 2010) así como para conocer los efectos de uno o varios estresores ambientales luego de una aplicación directa o indirecta (ensayo *in vivo*) (Mouchet y col. 2007, Nikoloff y col. 2014, Pérez-Iglesias y col. 2014). Finalmente, este estudio sostiene la idea de que el ensayo cometa o EC es un método altamente sensible para detectar daño en el ADN inducido por los estresores ambientales tanto en larvas de ambas especies como en adultos de *B. pulchella*.

5.1.3.2 Efectos crónicos en larvas

El presente estudio corrobora que IMZT es capaz de inducir efectos adversos a nivel de individuo y citogenético luego de una exposición crónica a una concentración subletal del herbicida. Cabe destacar que varios estudios han corroborado que la exposición crónica de larvas de anfibios a plaguicidas afecta la metamorfosis, la masa corporal, aumenta la presencia de anomalías morfológicas, entre otros efectos a nivel de individuo. En particular, muchos estudios han demostrado efectos adversos a nivel de individuo producidos por herbicidas como atrazina (Rohr y col. 2003, Freeman y Rayburn 2005, Williams y Semlitsch 2010), butaclor (Liu y col. 2011), cicloxidim (Wagner y col. 2015), glifosato (Howe y col. 2004, Williams y Semlitsch 2010, Navarro-Martin y col. 2014) y metaloclor (Williams y Semlitsch 2010); de insecticidas como basudin (Ezemonye e Ilchie 2007), carbaril (Bridges 2000, Rohr y col. 2003), cipermetrina (Greulich y Pflugmacher 2003) o permetrinas (Berril y col. 1993), clorpirifos (Bernabó y col. 2011), endosulfan (Rohr y col. 2003, Brunelli y col. 2009, Denoel y col. 2012, Lavorato y col. 2013) e imidacloprid (Robinson y col. 2017); o inclusive de fungicidas como pirimetanil y tebuconazol (Bernabó y col. 2016). En general, estos estudios remarcan que los biomarcadores individuales se encuentran afectados debido a la presencia de estresores ambientales que conducen a una reasignación de energía para la activación y el mantenimiento de los mecanismos de detoxificación y dicha situación limita los recursos para el crecimiento y el desarrollo óptimo de los renacuajos (Bernabó y col. 2016). Por otra parte, Bernabó y col. (2016) en estudios crónicos realizados sobre otra especie de hylido han remarcado que una posible explicación para el retraso observado en la metamorfosis podría ser que principalmente la producción y la función de la hormona tiroidea se vea interrumpida por la acción de los estresores ambientales y esta situación está acompañada por efectos adversos que pueden ocurrir en uno o varios tejidos diana. Sin embargo, es importante destacar que los resultados de este estudio

respaldan la hipótesis que explica que los procesos de desarrollo y las trayectorias de crecimiento en larvas de anuros están condicionados por la exposición a diferentes estresores ambientales presentes en los ambientes donde estos organismos viven y esta situación puede dar lugar a una menor probabilidad de supervivencia para las larvas (Bernabó y col. 2016). A pesar de esto, son necesarios más estudios que intenten responder estas preguntas.

No obstante, los estudios previamente mencionados demuestran efectos adversos irreversibles a nivel individual por la exposición crónica a concentraciones subletales de plaguicidas, lo cual no permite que estos puntos finales (evaluación de efectos morfológicos, de crecimiento o desarrollo) sean utilizados como señales tempranas en escenarios donde el ingreso de los contaminantes ambientales a los cuerpos de agua es constante. Considerando este escenario, los resultados observados en este estudio al evaluar los biomarcadores citogenéticos demuestran su importancia para este tipo de estudios de toxicidad crónica dado que detectan efectos adversos en etapas tempranas. Por ejemplo, en este estudio a los 28 días comienzan a evidenciarse efectos adversos citogenéticos tanto por la técnica de MNs como por el EC; mientras que los efectos en la metamorfosis a nivel de individuo se detectan recién luego del día 42. Por otra parte, en los biomarcadores a nivel de organismo se detectaron diferencias significativas respecto del grupo control para la condición corporal desde el primer día de sacrificio evaluado (día 28) pero dichas diferencias no se detectan hacia el final del bioensayo (día 42) ya que los individuos que alcanzan la metamorfosis invierten su energía en este proceso lo que desencadena gran pérdida de masa y energía (Howe y col. 2004, Brunelli y col. 2009, Bernabó y col. 2011, Bernabó y col. 2016). En este sentido, es relevante considerar estos cambios en anfibios y sacrificios en diferentes tiempos de la exposición al momento de realizar bioensayos de toxicidad crónica dado que podrían enmascarse resultados importantes u obtener resultados inconsistentes no sólo al evaluar los biomarcadores a nivel de organismo sino también en otros niveles como histológico, bioquímico y citogenético que pueden verse alterados por la metamorfosis.

Finalmente, se puede afirmar a partir de estos estudios que los biomarcadores citogenéticos cumplen con las condiciones de ser herramientas que detectan efectos antes que el daño sea irreversible. De cualquier manera, a pesar de la importancia de utilizar los biomarcadores citogenéticos para estudios de gran relevancia ambiental, en la actualidad la información de este tipo es escasa y fragmentada, existiendo sólo algunos reportes que mencionan la utilización de biomarcadores citogenéticos en bioensayos crónicos (Freeman y Rayburn 2005, Fernando y col. 2016). En este sentido, se considera necesario a partir de este trabajo realizar nuevas investigaciones que consideren escenarios de exposición más realistas (como evaluaciones de situaciones crónicas que ocurren frecuentemente) donde se ponga a prueba la respuesta de una batería de biomarcadores a diferentes niveles y que consideren los estadios de desarrollo larval.

5.1.3.3 Evaluación del daño oxidativo en larvas

En general, pocos autores han intentado responder el tipo de daño genético que producen los plaguicidas sobre la molécula de ADN de vertebrados acuáticos (Guilherme y col. 2012, Lajmanovich y col. 2015) y en muchos casos donde se ha investigado el efecto o modo de acción tóxica de los plaguicidas esta pregunta sigue sin ser respondida. En este estudio, con el fin de elucidar un posible mecanismo sobre como IMZT induce daño en el ADN, fueron empleadas las enzimas de restricción Endo III y Fpg que en combinación con el EC permiten revelar la presencia de pirimidinas y purinas oxidadas, respectivamente. Los resultados actuales de este trabajo demostraron claramente que la exposición a 0,39 mg/l de IMZT no sólo es capaz de inducir daño en el ADN de células sanguíneas circulantes de las larvas de *B. pulchella* sino que parte de ese daño se produce por oxidación de purinas.

Este tipo de evaluaciones sobre el daño oxidativo del ADN se puede utilizar para evaluar el potencial genotóxico-carcinogénico de los estresores ambientales. A su vez, esta evaluación directa del daño oxidativo puede proporcionar información importante sobre los efectos moleculares del estrés oxidativo en el ADN inducido por plaguicidas (Collins y col. 1996). Es importante destacar que los métodos empleados actualmente para medir el daño oxidativo en el ADN, distintos al EC con enzimas de restricción, tienen ciertas limitaciones como ser ensayos semi-cuantitativos lo que puede producir resultados engañosos (Halliwell 2000, Collins 2004, Gedik y Collins 2005). Por el contrario, el EC modificado es uno de los métodos más prometedores para detectar el potencial genotóxico de los xenobióticos al ser una técnica simple, rápida, específica y sensible. Otro beneficio del EC modificado es que requiere muestras pequeñas y puede cuantificar directamente la cantidad de daño oxidativo en el ADN (Tice y col. 2000, Collins 2004). Además, las endonucleasas específicas de las lesiones en el ADN, como Fpg o Endo III, pueden reconocer específicamente que bases han sido dañadas por oxidación lo que brinda una mejor información sobre el modo de acción del plaguicida o estresor ambiental (Collins 2004, Smith y col. 2006, Collins y Azqueta 2012). En este sentido, se puede enfatizar la importancia de utilizar la técnica del EC modificada para evaluar el daño oxidativo en el ADN de los anfibios como consecuencia de la exposición a plaguicidas. Este estudio además revela que el tratamiento con los buffers de incubación para Endo III y Fpg induce un aumento en la frecuencia del daño del ADN. Esta observación concuerda con reportes previos que indican la capacidad de estos buffer enzimáticos para inducir lesiones en el ADN celular lo que conlleva a un aumento de daño de los nucleoides (Collins y Azqueta 2012, Soloneski y col. 2016, 2017).

Específicamente, nuestros resultados utilizando el EC modificado indican que Fpg resultó ser altamente sensible y eficaz en la detección de daño oxidativo en el ADN inducido en bases púricas por la formulación de IMZT (Pivot® H) en el ADN de las células sanguíneas circulantes de las larvas de *B. pulchella*, pero no sucedió lo mismo cuando se utilizó Endo

III debido a que esta enzima no detectó daños oxidativos en bases pirimidínicas por acción del herbicida. Según la literatura, hasta el momento sólo Calevro y col. (1998) han analizado en ensayos con anfibios el grado de daño oxidativo del ADN empleando el EC modificado con Fpg, utilizando cultivos de células cerebrales primarias del tritón *Pleurodeles waltl* expuestos al cadmio (II). Estos autores determinaron que el cadmio (II) no es capaz de inducir daño oxidativo en el ADN de las células del cerebro de las larvas; sin embargo, demuestran que este metal tiene la capacidad de generar roturas de la cadena de ADN e interferir con la reparación del daño oxidativo inducido por xenobióticos (Calevro y col 1998). No obstante, hasta el momento, los resultados de este trabajo representan la primera evidencia de daño oxidativo del ADN causado por la exposición a un plaguicida utilizando el EC modificado con enzimas de restricción no sólo en una especie Neotropical como *B. pulchella* sino que también para todos los anfibios a nivel mundial. Como señaló Collins (2004), es importante incluir esta técnica del EC modificado en especies bioindicadoras para evaluar posibles efectos genotóxicos en situaciones de contaminación ambiental.

Finalmente, nuestras observaciones corroboran que el formulado comercial Pivot® H que contiene IMZT induce efectos genotóxicos (USEPA 1989, Liman y col. 2015) y actúa como un agente oxidante en organismos no diana, como también fue sugerido por Moraes y col. (2011).

5.1.3.4 Recuperación del daño genético

Los resultados de este bioensayo demostraron que la exposición aguda de larvas de *B. pulchella* durante 96 h a IMZT induce un incremento significativo de MNs, HNs y Buds así como también lesiones en el ADN. De cualquier manera, se observó que luego de transcurridos 7 días en la fase de post-exposición las larvas de *B. pulchella* recuperan sus niveles basales de MNs, HNs, Buds y frecuencias de células no dañadas. Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados en larvas de anuros de la rana africana *X. laevis* en los cuales se ha reportado la recuperación luego del daño genético inducido por estresores ambientales como hidrocarburos o cadmio (Morse y col. 1996, Mouchet y col. 2015). Sumado a esto, estudios con resultados similares se han realizado con especies de invertebrados y vertebrados acuáticos luego de la exposición a diferentes estresores ambientales tales como benzo[a]pireno y cadmio en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* (Michel y Vincent-Hubert 2015), hidrocarburos aromáticos policíclicos en el rodaballo *Scophthalmus maximus* y el lenguado común *Solea solea* (Wessel y col. 2010, Dû-Lacoste y col. 2013), mezclas de retardantes de llama en el pez gordo *Pimephales promelas* (Barr y col. 2010), los herbicidas glifosato y triclopir sobre la anguila europea *Anguilla anguilla* (Guilherme y col. 2014, Marques y col. 2014), clotrimazol en la carpa común *C. carpio* (Corcoran y col. 2014), metales pesados sobre la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Stankevičiūtė y col. 2016), el insecticida-acaricida organofosforado en el rohu *Labeo rohita* (Mohanty y col. 2011) o inclusive cianotoxinas en la tilapia del Nilo *Oreochromis*

niloticus (Guzmán-Guillén y col. 2014). Además, se ha observado también que las ratas Wistar recuperan sus valores basales de parámetros citogenéticos luego de la genotoxicidad ejercida por etil-carbamatos (Prado-Ochoa y col. 2016).

Los estudios previos evaluando las capacidades de recuperación han mostrado que el tiempo para recuperar los niveles basales de los parámetros citogenéticos luego de que un daño genético ocurrió puede variar ampliamente dependiendo de la especie. Por ejemplo, en peces se han reportado que periodos cortos de 72 h (Mohanty y col. 2011), mientras que en anfibios los periodos de recuperación pueden alcanzar hasta 14 días (Mouchet y col. 2015) y en ratas son mayores a 21 días (Prado-Ochoa y col. 2016). De acuerdo con Mohanty y col. (2011), la explicación del proceso de recuperación está asociada con una pérdida selectiva de células dañadas y el inicio de los procesos de reparación. A modo de breve explicación, al actuar ambos mecanismos de reparación pueden revertir el daño primario al ADN pero no la presencia de células con MNs, ya que estas desaparecerían por renovación celular o por el proceso de aceleración de la eritropoyesis que genera un efecto "de dilución" sobre la frecuencia de MNs. En este sentido, varios autores han sugerido que la recuperación rápida del daño genético inducido por los plaguicidas está relacionada con el inicio de procesos de reparación con escisión de bases y/o de nucleótidos en el ADN y estos sistemas de reparación a su vez involucran enzimas de reparación que actúan tanto en invertebrados acuáticos como vertebrados (Mohanty y col. 2011, Guilherme y col. 2014, Michel y Vincent-Hubert 2015, Mouchet y col. 2015). De cualquier manera, como fue mencionado previamente, la recuperación del daño genético puede estar asociada con un proceso de detoxificación y renovación de células dañadas que ocurre en órganos hematopoyéticos (Mohanty y col. 2011, Kaur y Dua 2016, Pérez-Iglesias y col. 2016).

De manera similar a lo observado con los MNs y anormalidades nucleares en eritrocitos, para este tiempo de sacrificio (7 días en fase de post-exposición), no hubieron variaciones en la frecuencia de los diferentes tipos de nucleoides respecto del grupo control, independientemente del grado de daño que presentaban las larvas durante la fase de exposición a IMZT. Por otra parte, se observó la persistencia de eritrocitos dañados con elevada frecuencia de MNs en aquellas larvas expuestas a CP (control positivo) sólo luego de 7 días en la fase de post-exposición, aunque esta situación no ocurrió en los días posteriores. Aunque pueda ser especulativo, es posible imaginar una explicación para nuestros hallazgos en *B. pulchella*. Hace años, Mohanty y col. (2011) sugirieron que la etapa anterior a la apoptosis puede estar dada por la presencia de nucleoides altamente dañados (nucleoides tipo III y IV) durante los periodos iniciales de exposición a los plaguicidas y conforme pasa el tiempo ocurre la eliminación de células muertas por apoptosis lo que conduce a un mayor tiempo de recuperación. En ese sentido, por los resultados obtenidos no podemos descartar esta posibilidad. Desafortunadamente, en nuestros estudios no incluimos estimaciones sobre frecuencia de las células apoptóticas; por lo tanto, futuros trabajos deberían focalizarse en resolver estas posibles conexiones con el fin de ayudar a entender los mecanismos que subyacen en la recuperación no sólo de anfibios sino de vertebrados en general.

Si ponemos el enfoque sobre los efectos registrados a nivel individual en la fase de post-exposición del experimento, se encontró que las larvas retienen durante esta fase las anomalías morfológicas correspondientes a la pérdida de queratodonte observadas al final de la fase de exposición aguda independientemente del tiempo evaluado. En contraste, las alteraciones a nivel de individuo registradas, como el retraso en el estadio de desarrollo y la presencia de anomalías axiales, fueron observadas sólo durante la fase de post-exposición en larvas previamente expuestas a IMZT y colocadas durante 14 días en agua de bioensayo sin herbicida. En concordancia con estos resultados, varios autores han demostrado que los efectos adversos a nivel de individuo observados a partir de la fase de post-exposición pueden deberse a la bioacumulación de los plaguicidas en los tejidos de los renacuajos (Bernabò y col. 2013, Vogiatzis y Loumbourdis 1997). Sumado a esto, la ausencia de alteraciones significativas en la fase de desarrollo durante la fase de exposición podría estar relacionada con la utilización de una baja concentración del estresor ambiental y en un corto tiempo de exposición, tal como han sugerido Bulaeva y col. (2015) en larvas de la rana de madera *Lithobates sylvaticus* expuestas al perclorato de sodio. De cualquier manera, se ha reportado que aunque las larvas de anuros sean transferidas a sitios con agua libre de contaminantes luego de una exposición aguda a plaguicidas, éstas pueden retener las anomalías morfológicas resultantes de la exposición aguda así como también puede verse afectado el estadio de desarrollo cercano al clímax metamórfico (Bernabò y col. 2013, Bulaeva y col. 2015).

Es importante remarcar que los efectos subletales inducidos por los estresores ambientales a nivel de individuo pueden llevar a grandes consecuencias a nivel poblacional. En este punto, algunos investigadores han sugerido que las anomalías morfológicas inducidas por los plaguicidas pueden resultar en una mayor dificultad de las larvas para escapar a los predadores y entonces estos organismos se verán forzados a invertir más energía para la adquisición de alimento o también podrían estar imposibilitados de forrajear. Esta situación afectará el desarrollo y crecimiento y consecuentemente se producirán efectos adversos sobre el bienestar o *fitness* de las larvas y posiblemente sobre las poblaciones de anfibios que habitan agroecosistemas (Bernabò y col. 2013, Bach y col. 2016). Además de esto, a partir de las observaciones realizadas por Xu y Huang (2017), quienes recientemente analizaron los efectos de los enantiómeros de α -cipermetrina sobre el crecimiento y los parámetros bioquímicos asociado a la bioacumulación en larvas de *Rana nigromaculata*, se ha propuesto que la inhibición en el crecimiento de larvas de anuros a bajas concentraciones del plaguicida sea utilizada como un biomarcador de toxicidad válido y sensible para evaluar efectos en el desarrollo. Mouchet y col. (2015) sugieren que la etapa de desarrollo larval que precede a la metamorfosis es muy importante porque durante esta etapa hay elevados niveles de actividad metabólica que permite la recuperación rápida luego un daño citogenético. En ese sentido, se resalta la importancia de considerar para futuros estudios ecotoxicológicos todas las fases del desarrollo en los anuros. Los datos obtenidos del ensayo de recuperación en este trabajo de tesis respaldan este concepto ya que los

renacuajos expuestos de *B. pulchella* recuperaron valores basales de los biomarcadores empleados para genotoxicidad luego de la primera semana en fase de recuperación.

Finalmente, se sugiere que el diseño experimental utilizado en este trabajo sea considerado para futuras investigaciones en las cuales se evalúen las capacidades de recuperación de los anfibios luego de la exposición a un estresor ambiental ya que este bioensayo no sólo considera un periodo que cubre completamente la etapa de detoxificación sino que también contempla el ciclo de desarrollo larval en su totalidad. No obstante, a partir de estudios previos realizados en la carpa común *C. carpio* se conoce que los residuos del herbicida IMZT pueden persistir hasta periodos de 10 a 35 días en los tejidos de los peces, tiempo en el cual aún se detectan efectos en la actividad enzimática y se determinó que esta respuesta fisiológica estaba asociada a mecanismos de supervivencia en estos organismos (Moraes y col. 2011). En este contexto, este tipo de bioensayos deben llevarse a cabo en conjunto con investigaciones que intenten conectar la bioacumulación de los plaguicidas en los tejidos y la posterior depuración, la actividad de las enzimas involucradas en la depuración y reparación y los procesos de eritrocateresis involucrados en estas respuestas, lo cual ayudará a entender de mejor manera la capacidad de recuperación o resiliencia de los vertebrados acuáticos como los anfibios luego de un evento de exposición aguda a contaminantes y también el modo de acción y los efectos de los estresores ambientales a niveles superiores de organización.

5.1.4. Interpretación sobre los efectos subletales de IMZT en larvas y adultos de las especies estudiadas

5.1.4.1 Sobre los efectos subletales a nivel bioquímico

En cuanto a las respuestas bioquímicas observadas en larvas y adultos luego de la exposición a IMZT, los resultados de este estudio demuestran que IMZT produce estrés oxidativo corroborado por el incremento en la actividad de CAT en larvas de *B. pulchella* y GST en larvas de *L. latinasus* así como también produce alteraciones en la actividad control de CAT y GST en adultos de ambas especies. Sumado a esto, IMZT también es capaz de inducir alteraciones en la actividad de AChE en larvas de *B. pulchella* y en adultos de ambas especies. En este sentido, en total acuerdo con las investigaciones realizadas en peces por Pasha y Singh (2005), Moraes y col. (2011) y Pasha (2013), quienes reportan que IMZT altera las mismas enzimas, los resultados de este trabajo pueden indicar que IMZT causaría un aumento de las ROS (ya sea durante su metabolismo o por su mecanismo de acción) y además produce alteraciones en las funciones normales de las colinesterasas o el sistema colinérgico de los anuros locales.

Las ROS son especies que están presentes en todas las células y se generan durante el metabolismo oxidativo mitocondrial (ocurre durante el consumo de oxígeno y allí se produce la transferencia de electrones o la reducción incompleta de oxígeno en las mitocondrias), así como en la respuesta celular a xenobióticos, citoquinas e invasión

bacteriana. El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio debido al exceso de ROS u oxidantes sobre la capacidad de la célula para llevar a cabo una respuesta antioxidante efectiva. En definitiva, las ROS son especies altamente reactivas que puede afectar a los lípidos de membranas y los ácidos nucleicos por lo que la regulación del delicado balance entre la producción de ROS y la activación de defensas celulares antioxidantes, como las enzimas CAT y GST, es esencial para mantener la viabilidad celular (debido a que participan en la eliminación de las ROS) (Ferrari y col. 2008). De esta manera, el incremento observado en la actividad de CAT y GST en larvas de ambas especies y adultos de *B. pulchella* es considerado como una respuesta beneficiosa frente a una situación de estrés ya que la enzima CAT evita la oxidación en células antes que el sistema respiratorio tome un rol activo en el intercambio gaseoso de defensa anti-oxidativa y el incremento de GST conduce a la activación de sistemas detoxificadores que contraatacan los efectos dañinos de las ROS. Específicamente, la actividad de GST está involucrada en la fase II de biotransformación de xenobióticos en conjunto con el sistema de monooxigenasas dependiente de CYP-450 y de esta manera, previene el daño oxidativo luego de una exposición aguda tanto en larvas como en adultos de anuros (Ferrari y col. 2008, 2011, Attademo y col. 2014b).

En particular, el incremento significativo de CAT para larvas de *B. pulchella* y en adultos de *L. latinasus* sugiere que esta enzima actúa como una de las principales defensas antioxidante para estos organismos frente a la acción de un herbicida de características pro-oxidantes como IMZT en su formulación Pivot® H (Ferrari y col. 2011). Del mismo modo, el incremento en la actividad de GST observado en larvas de *L. latinasus* indica que la enzima está involucrada en el sistema de defensa antioxidante dominante de estos organismos (Ferrari y col. 2011). No obstante, la respuesta de GST a IMZT en larvas de anuros de ambas especies es contraria a lo reportado por Moraes y col. (2011) quienes encuentran una disminución de la actividad de GST en la carpa *C. carpio*. Sin embargo, la respuesta encontrada por estos autores concuerda con lo observado en adultos de ambas especies donde se evidenció que GST disminuía por la acción de una formulación de IMZT. Esta situación demuestra que la acción del herbicida no es específica para una enzima diana en particular sino que la respuesta antioxidante dependerá de la especie estudiada y el sistema antioxidante que predomine. En los casos donde se detectó inhibición de las enzimas antioxidantes puede deberse a un mal funcionamiento fisiológico producto de algún tipo de deshidratación asociado con la anoxia en las ranas expuestas. En particular, la anoxia en anuros podría ocurrir por intercambios iónicos y osmóticos como resultado de un incremento de la deshidratación y cambios de viscosidad en la sangre lo que produce disminución del flujo sanguíneo y del oxígeno transportado en sangre; y finalmente esta situación acabará comprometiendo la oxigenación en tejidos y órganos (Brodeur y col. 2012). A pesar de esto, en este estudio se destaca que GST es la enzima detoxificante y antioxidante que responde para ambas especies estudiadas tanto en larvas como adultos y en este sentido, se ha probado que la actividad de GST resulta un buen biomarcador en anuros no sólo para estudios de laboratorio sino también para estudios de campos como ha remarcado Ferrari y col. (2011).

Por otra parte, de manera similar a lo reportado en *C. carpio* por Moraes y col. (2011), nuestros estudios revelaron que en larvas de *B. pulchella* y adultos de ambas especies se observó un aumento significativo de AChE. Puntualizando en esta enzima, es bien conocido que tiene un importante rol en sistema colinérgico actuando en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas y en las uniones neuromusculares. En este sentido, se ha utilizado la enzima AChE como biomarcador en muchos estudios con anuros debido a que puede verse alterada por la acción de muchos plaguicidas y su respuesta puede variar según el tipo de tejido y el organismo en que se analiza (Lajmanovich y col. 2010). En este contexto, en este estudio se observaron aumentos significativos de AChE y esta situación estaría indicando claramente que algunos metabolitos derivados del herbicida estarían afectando el sistema colinérgico (circuitos neuronales del sistema nervioso parasimpático) y promoviendo efectos adversos indeseables (Moraes y col. 2011).

En este trabajo encontramos que todas las enzimas en larvas de *B. pulchella* responden al tratamiento con IMZT. En concordancia con estos resultados, estudios previos realizados en vertebrados acuáticos como peces reportan alteraciones en los mismos biomarcadores bioquímicos luego de la exposición experimental a formulaciones comerciales que contienen IMZT (Moraes y col. 2011, Pasha y col. 2013). Por otro lado, en este trabajo también encontramos que en los adultos de *B. pulchella* se produce un aumento de AChE y una disminución marcada de las enzimas antioxidantes y/o detoxificantes como CAT y GST, con respecto a esta respuesta. Sumado a esto, estudios previos han utilizado estos biomarcadores en adultos de esta especie evaluando la respuesta de CAT, GST y colinesterasas en ranas que habitan agroecosistemas y ranas de sitios no perturbados (Brodeur y col. 2012). En particular, los estudios realizados por Brodeur y col. (2012) reportan un incremento en la actividad de CAT en ranas de *B. pulchella* que habitan agroecosistemas. En este sentido, nuestros estudios revelan por primera vez que todas las enzimas aquí evaluadas responden a los plaguicidas no sólo en *B. pulchella* sino también para adultos de *L. latinasus*. Específicamente, este es el primer reporte en larvas y adultos de *L. latinasus* utilizando biomarcadores bioquímicos como respuesta frente a estresores ambientales. De cualquier manera, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las enzimas aquí empleadas son útiles para evaluaciones ecotoxicológicas tanto *in vivo* como *in situ*.

Finalmente, este trabajo representa en el primer reporte de alteraciones en la actividad de enzimas colinesterasas y en las enzimas que intervienen en los procesos antioxidantes por la exposición aguda a IMZT tanto en larvas como en anuros adultos. En definitiva, y de acuerdo a lo planteado por Ferrari y col. (2011) y Newman (2014), resulta importante utilizar de manera integral los biomarcadores bioquímicos de estrés oxidativo y las colinesterasas en anuros como una herramienta útil para evaluar, no sólo la exposición a insecticidas anticolinesterásicos, sino también la exposición a otros estresores ambientales con el fin particular de conocer el estado celular y fisiológico de un organismo y en general para biomonitoreos de la fauna asociada a los ecosistemas acuáticos localizados en sitios perturbados como los sistemas agrícolas.

5.1.4.1 Sobre los efectos subletales a nivel histológico

Los efectos subletales a nivel histológico de este estudio demuestran por primera vez que IMZT produce lesiones histopatológicas tales como HV y AS y además afecta los MMC hepáticos tanto de larvas de *B. pulchella* como en adultos de *L. latinasus*. Particularmente, IMZT indujo aumentos en la frecuencia de MMC por área de hígado en larvas de *B. pulchella* y provocó alteraciones en el área ocupada por los pigmentos melanina, lipofuscina y hemosiderina en el hígado de adultos de *L. latinasus*. Sumado a esto, este trabajo constituye el primer reporte de un herbicida afectando los MMCs en larvas de *B. pulchella*, mientras que para *L. latinasus* se corroboró el uso de estas células como biomarcadores histológicos frente a la acción de plaguicidas como previamente se había reportado para esta especie (Pérez-Iglesias y col. 2016).

Al evaluar estos biomarcadores resulta importante mencionar que otros autores han estudiado el daño en el hígado causado por plaguicidas y han resaltado la importancia de evaluar efectos en este órgano ya que es el principal sitio de detoxificación para los xenobióticos y es un órgano vital para mantener la homeostasis en anuros (McDiard y Altig 1999, Paunescu y col. 2010, Çakici 2015). Como consecuencia de la exposición a plaguicidas, el hígado de animales ectotérmicos puede sufrir importantes cambios funcionales que implican tanto estructuras anatómicas básicas como estructuras y componentes celulares tales como enzimas detoxificadoras, hepatocitos, eritrocitos y MMC. En particular, en este estudio observamos un incremento en la frecuencia de las patologías hepáticas para las mayores concentraciones subletales evaluadas tanto en larvas como adultos. Según Gürkan y Hayrettaş (2012), esta situación puede ser un indicio de daños irreversibles que consecuentemente terminan en la degeneración hepatocelular. Varios estudios realizados en anuros soportan esta idea ya que han demostrado que altas concentraciones de herbicidas e insecticidas producen daño en las estructuras del hígado que conducen a un incremento en la tasa de apoptosis celular hepática e inclusive se ha señalado que principios de carcinogénesis pueden estar asociados a procesos de hipervascularización (Zaya y col. 2011, Paunescu y col. 2010, Çakici 2015, Pérez-Iglesias y col. 2016).

Los resultados obtenidos de este trabajo son consistentes con estudios previos realizados en anuros que demuestran la alteración producida en el sistema pigmentario hepático (MMC) por estresores ambientales (Paunescu y col. 2010, Zaya y col. 2011, Gürkan y Hayrettaş 2012, Franco-Belussi y col. 2013, 2016, Çakici 2015, Pérez-Iglesias y col. 2016). Además, si consideramos que la función de los MMC en el hígado de vertebrados acuáticos está directamente relacionada con el sistema inmune (Fenoglio y col. 2005, Brodtkin y col. 2007, Zaya y col. 2011) se puede afirmar que el aumento de MMC en larvas de *B. pulchella* estaría asociado a la detoxificación de IMZT dado que estas células tienen una tarea fundamental en los procesos inflamatorios como resultado de sus propiedades fagocíticas y confieren protección al órgano, compartiendo funciones con el sistema antioxidante enzimático (GST y CAT) en larvas (Brodtkin y col. 2007, Mela y

col. 2013). Por último, si consideramos que los efectos adversos inducidos por IMZT a nivel citogenético, bioquímico e histológico reportados en este trabajo para larvas de *B. pulchella*, se puede afirmar que este herbicida en su formulación comercial Pivot® H no sólo es un agente hepatotóxico sino que en general también es causante de alteraciones fisiológicas en este grupo de animales.

Los análisis de los biomarcadores histológicos en adultos mostraron alteraciones en los pigmentos de los MMC hepáticos por la exposición a IMZT en ambos escenarios evaluados y en los tiempos de exposición considerados. En general, ha sido mencionado que los MMC y sus pigmentos asociados (melanina, lipofuscina y hemosiderina) son importantes en los procesos catabólicos como respuesta inmune, como detoxificadores y como protectores frente a las ROS (Fenoglio y col. 2005, Franco-Belussi y col. 2013). Varios autores han destacado que un aumento en los MMC puede deberse al incremento del daño oxidativo que ocurre en las membranas celulares, al incremento de los procesos de muerte celular o por la acumulación de lipofuscina dentro de los MMC (Coulliard y Hodson 1996, Fenoglio y col. 2005, Franco-Belussi y col. 2013, Pérez-Iglesias y col. 2016). Otros estudios han reportado que un incremento en el número de MMC, en organismos expuestos a bajas concentraciones de estresores ambientales, se debe a la capacidad de este sistema de defensa celular para eliminar los residuos por un aumento de la actividad fagocítica (Agius y Roberts 2003). En concordancia con esta idea, varios trabajos utilizando los MMC como biomarcadores han evaluado los cambios morfológicos de estas células y su función inmunológica en anuros frente a estresores ambientales como aguas contaminadas por desechos cloacales (Franco-Belussi y col. 2013) y por variaciones de la temperatura (Santos y col. 2014).

En este trabajo, a partir de los resultados en adultos de *L. latinasus* observamos que la respuesta a IMZT coincidió con lo reportado previamente por nuestro grupo para esta especie, al ser expuesta al herbicida glifosato mediante inyección intra-peritoneal, observándose un aumento significativo en el área de lipofuscina luego de 48 h de exposición. En base a esto se propuso que a bajas concentraciones del herbicida ocurría un aumento de los productos de polimerización oxidativa relacionado con una respuesta contra los radicales libres (Pérez-Iglesias y col. 2016). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, los resultados no sólo corroboran que la especie responde a las 48 h luego de la exposición a un herbicida sino que también ocurre el aumento observado en el pigmento lipofuscina en la menor concentración ensayada del herbicida IMZT y esta situación podría estar indicando una respuesta antioxidante contra los radicales libres ya que los sistemas enzimáticos antioxidantes no responden (el caso de CAT) o están inhibidos (el caso de GST) para esa concentración y en ese tiempo. Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que a las 96 h ocurre una disminución significativa en el área de los pigmentos melanina y hemosiderina en los MMC hepáticos. Según estudios previos, la disminución de estos pigmentos está asociada con una reducción de la actividad fagocítica y protectora contra agentes oxidantes de los MMC en el hígado (Bucke y col. 1992, Fenoglio y col. 2005, Pérez-Iglesias y col. 2016). Si nos

focalizamos propiamente en la respuesta del pigmento catabólico hemosiderina en S1, en este trabajo nuevamente se reportan resultados similares a los descriptos previamente para esta especie luego de la exposición a un herbicida (Pérez-Iglesias y col. 2016). En este sentido, consideramos válidas las afirmaciones realizadas previamente por Pérez-Iglesias y col. (2016) quienes resaltan que al ser hemosiderina un producto metabólico intermediario generado durante el reciclado de componentes provenientes de la eritropoyesis, la disminución de este pigmento (producto de la exposición al herbicida) puede estar relacionada a daños más severos que implican alteraciones en los procesos catabólicos hepáticos en general y en el reciclado de compuestos férricos en particular. Dicha observación es corroborada en este estudio por el aumento significativo de MNs en eritrocitos de células sanguíneas circulantes para ese escenario y en ese tiempo evaluado, lo cual estaría indicando alteraciones en el normal funcionamiento de la eritrocateresis y esta función en anuros depende de los MMC hepáticos (Aguis y Roberts 2003, Fenoglio y col. 2005). No obstante, la respuesta observada en melanina en este trabajo fue contraria a lo reportado por Pérez-Iglesias y col. (2016) quienes observan un aumento en este pigmento por la exposición a glifosato y asocian esta respuesta a la función citoprotectora de melanina para proteger al hígado de los ROS. En el presente estudio, se reporta la disminución del pigmento melanina para ambos escenarios y esta disminución de melanina causaría una pérdida de la función citoprotectora de los MMC. En particular, en S1 el aumento observado en CAT indicaría que este es el sistema antioxidante que prevalece sobre la función de los MMC para evitar el daño hepático; sin embargo la situación es diferente en S3 donde no observamos que las enzimas antioxidantes evaluadas respondan a la acción del herbicida y se registran daños hepáticos tales como HV y AS. En este contexto, como fue afirmado anteriormente, en altas concentraciones de plaguicidas el daño hepático es irreversible por lo cual los MMC del hígado pierden sus capacidades de respuesta fisiológica para mantener los procesos de renovación celular así como también las funciones antioxidantes y detoxificadoras (Brodkin y col. 2007). En este sentido, la fisiología y el bienestar o *fitness* de los anuros expuestos a plaguicidas estaría afectado negativamente por la incapacidad del hígado para eliminar o detoxificar los xenobióticos y los componentes celulares dañados del organismo (Pérez-Iglesias y col. 2016).

A partir del contexto anteriormente planteado, consideramos que efectivamente los MMC son biomarcadores del estado de salud de anfibios a nivel histológico y celular tanto en larvas como adultos. No obstante, como mencionamos anteriormente, se necesitan nuevos estudios de este tipo en especies neotropicales que permitan asociar la respuesta de los biomarcadores histológicos, bioquímicos y citogenéticos con la acción de los estresores ambientales y las características fisiológicas de cada especie, si consideramos la gran cantidad de modos de vida de los anuros en esta región. En definitiva, generando ese tipo de información se podrá reforzar la idea de la utilidad de los MMC como biomarcadores de efecto y exposición.

5.1.4.3 Sobre los efectos subletales a nivel individual

El presente trabajo de Tesis Doctoral también demostró que la exposición experimental a IMZT en concentraciones subletales induce alteraciones en el comportamiento en larvas de ambas especies así como también anormalidades morfológicas tales como pérdida parcial o total de los queratodontes en ambas especies y deformaciones en el cuerpo de larvas de *L. latinasus*. En este sentido, si consideramos un escenario más realista, las larvas de anuros que presentan estas alteraciones a nivel de individuo podrían resultar menos activas para la competición inter- e intra- específica (alteraciones en la natación) o inclusive podrían presentar un bienestar disminuido debido a una nutrición pobre o escasa (ausencia de queratodontes imposibilita el forrajeo) y en definitiva, esta situación posiblemente conduciría una elevada mortalidad en la etapa larval de los anuros y además estarían menos disponibles para los predadores. En caso contrario, si se considera otro posible escenario, si las larvas sobreviven la tasa de predación podría incrementar debido a su dificultad para escapar. En este contexto, y de acuerdo con otros autores, es importante no descartar que ambos escenarios pueden ocurrir en simultáneo y dicha situación puede tener consecuencias negativas a nivel poblacional o inclusive a nivel de comunidad (Junges y col. 2010, Peltzer y col. 2013, Bach y col. 2016). Sin embargo, son necesarios más estudios a nivel de comunidad en especies neotropicales que evalúen estas relaciones intra- e inter- específicas luego de la exposición a un estresor ambiental.

Evaluando el caso de adultos, se observó una disminución en el IHS de *L. latinasus* por la exposición a IMZT en ambos escenarios mientras que en *B. pulchella* se observó una disminución significativa del índice K cuando fueron expuestas a S3. Estos resultados refuerzan la idea de utilizar estos puntos finales como biomarcadores a nivel de individuo en anuros adultos que se encuentran en situaciones de estrés en los ambientes que habitan. En particular, Brodeur y col. (2012) reportan que adultos de *B. pulchella* que habitan agroecosistemas presentan una reducción del IHS y explican que esta respuesta particular es consistente con situaciones de estrés como sequías, nutrición pobre o inclusive exposición a diferentes plaguicidas. En este trabajo, no se detectaron alteraciones del índice K para *L. latinasus* aunque no se descarta utilizar este biomarcador para la especie ya que diferentes autores que han reportado su eficacia en estudios de campo en ranas que habitan sistemas agrícolas (Brodeur y col. 2011, Guerra y Aráoz 2016). Respecto a la disminución del índice K observado en adultos de *B. pulchella*, este tipo de respuesta estaría asociada con organismos que presentan escasas reservas energéticas y por lo tanto un bienestar o *fitness* reducido; además se sugiere que las ranas afectadas en su condición corporal pueden presentar complicaciones en los parámetros ecológicamente relevantes tales como el bienestar reproductivo y la supervivencia (Brodeur y col. 2011). Finalmente, se destaca que los resultados presentados en este estudio aportan nueva evidencia de que ambas especies son útiles para evaluar este tipo de biomarcadores no sólo en ambientes perturbados sino también en bioensayos de laboratorio.

5.1.5 Análisis integral de los biomarcadores a distintos niveles biológicos

En los últimos años, Venturino y col. (2003) y Newman (2014) han destacado la importancia de evaluar la correlación de los biomarcadores en su conjunto y no separadamente ya que esta información ayuda a entender no sólo la susceptibilidad de los organismos a los estresores ambientales sino también el modo de acción y la toxicidad de éstos. Además, señalan que es necesario focalizarse en aquellos biomarcadores que presenten correlaciones positivas o negativas con la mortalidad dado que podrán ser utilizados posteriormente como señales de alerta temprana en ambientes perturbados o contaminados por la presencia de estresores ambientales (Venturino y col. 2003, Newman 2014). No obstante, la información ecotoxicológica que evalúa la correlación de efectos adversos a diferentes niveles de organización biológica es escasa y de hecho hasta el momento los reportes de la literatura evalúan de forma aislada cada punto final teniendo poca consideración sobre las implicancias que hay en un nivel inferior o superior.

En este trabajo, el análisis multivariado utilizando una batería de biomarcadores y correlacionando las respuestas a diferentes niveles de organización biológica permitió generar información novedosa no provista por el análisis individual y separado de cada biomarcador. Una evidencia clara que soporta esta idea fue encontrar que los efectos adversos en larvas de anuros responden un gradiente creciente de concentraciones del herbicida y que tales respuestas se suceden de forma progresiva conforme aumenta el nivel de organización biológica, esto a su vez permitió comprobar que tanto los biomarcadores citogenéticos como bioquímicos actúan como señales de alerta temprana antes que la mortalidad ocurra. Esta información además demuestra que los puntos finales evaluados responden al concepto de biomarcadores propuesto por Walker y col. (2009) según fue explicado en el capítulo 1. Por otra parte, en adultos el PCA utilizando los biomarcadores evaluados en este trabajo permitió la separación de aquellas ranas expuestas a IMZT respecto del grupo control, poniendo de manifiesto que los efectos adversos de IMZT inducen alteraciones en las respuestas fisiológicas evidenciado al evaluar biomarcadores en diferentes niveles de organización biológica.

El enfoque holístico del análisis multivariado no sólo permite realizar la evaluación de múltiples puntos finales de manera simultánea sino que también facilita la comprensión general y particular sobre los diversos efectos que produce la exposición experimental a un estresor ambiental, lo cual constituye una ventaja para este tipo de análisis en contraste con la información separada que brindan los análisis convencionales. En este sentido, cabe destacar que en este trabajo el análisis de PCA, en particular a matriz de correlación, demuestra una correlación significativa entre los diferentes biomarcadores evaluados en el mismo nivel ecotoxicológico tanto en larvas como en adultos de anuros. En conclusión, y de acuerdo con otros autores (Venturino y col. 2003, Van der Oost y col. 2003, Newman 2014), se debe recomendar el uso de este tipo de enfoque para estudios ecotoxicológicos dado que permite discernir los grupos de anuros que fueron expuestos a estresores ambientales de aquellos que no fueron expuestos utilizando biomarcadores a diferentes niveles

biológicos sea individual, histológico, bioquímico o citogenético y que además evaluados en su conjunto comprueban que los plaguicidas causan estrés fisiológico en anuros autóctonos.

Finalmente, se propone para un futuro evaluar biomarcadores a diferentes niveles considerando menores tiempos de exposición e incorporando nuevos biomarcadores en otros niveles ecotoxicológicos para una comprensión integral del modo de acción de los nuevos contaminantes ambientales sobre anuros autóctonos. No obstante, estos resultados constituyen los primeros registros en los cuales se evalúan de manera integral los biomarcadores a distintos niveles de organización luego de la exposición al herbicida IMZT en larvas y adultos de anuros. Cabe destacar que ambas especies pampeanas utilizadas en este trabajo son buenos modelos para evaluar una batería de biomarcadores de efecto y exposición a herbicidas.

5.1.6 Relevancia ecotoxicológica de los estudios realizados

Las concentraciones de exposición a IMZT evaluadas en los diferentes diseños experimentales de este estudio fueron consideradas según los protocolos estandarizados para estudios de ecotoxicología y pensando en posibles escenarios que pueden ocurrir en los ambientes donde estas especies viven y se reproducen. No obstante, cabe señalar que en nuestro país sólo se tiene registro de un valor de IMZT en ecosistemas acuáticos, correspondiente a 14 µg/l de IMZT, encontrado para la cuenca Río Azul perteneciente a la provincia de Buenos Aires (Argentina) (Peluso y col. 2008). Cabe destacar que esta concentración de IMZT encontrada en esta cuenca de Argentina es casi 7,6 veces mayor que las concentraciones de IMZT más altas reportadas para aguas superficiales de Estados Unidos (Mattice y col. 2012) o incluso 51,8 y 40,0 veces mayores que las reportadas para el agua potable y las aguas superficiales de Brasil, respectivamente (Souza Caldas y col. 2011). En consecuencia, sería esperable que las concentraciones de IMZT empleadas en el presente estudio no estén presentes en el medio ambiente y que los organismos sólo estén expuestos luego de un evento específico como por ejemplo el drenaje en zanjás o descargas y derrames accidentales.

Sin embargo, es importante considerar que en los agroecosistemas de Argentina la concentración de aplicación recomendada para el producto es de 800 mg/l (Bindraban y col. 2009; CASAFE, 2013) y que además se ha demostrado que cuando se aplica el herbicida alrededor de un 3% de lo aplicado en campo alcanza el medio ambiente acuático por escorrentía superficial luego de irrigación continua o intermitente (Dias Martini y col. 2013). En este contexto, no podemos descartar la posibilidad de que las poblaciones de anfibios puedan estar en riesgo por exposición directa o indirecta a concentraciones cercanas a la HC5 determinada en este trabajo, así como también se considera un potencial riesgo para la salud de la población de trabajadores rurales agrícolas que entran en contacto con este herbicida durante las aplicaciones diarias. Sumado a esto, se destaca como importante que futuros trabajos se focalicen en evaluar la presencia de los nuevos plaguicidas (como IMZT) que se aplican en ambientes pampeanos-agrícolas y que presentan una elevada

toxicidad para organismos no diana. De cualquier forma, se demostró que las metodologías empleadas en el presente estudio pueden ser utilizadas en futuros estudios ecotoxicológicos cuando se quiere evaluar los efectos adversos de los estresores ambientales sobre anuros debido a la sensibilidad e información precisa que brindan.

5.2 Conclusiones

5.2.1 Conclusiones generales

Retomando punto a punto las hipótesis específicas planteadas, el presente trabajo de tesis nos permite corroborar que:

- I. La medición de los puntos finales propuestos permitió detectar en larvas y adultos de anuros pampeanos respuestas tempranas subletales a nivel bioquímico y citogenético en las concentraciones subletales ensayadas para el herbicida IMZT.
- II. Los puntos finales bioquímicos y citogenéticos propuestos son herramientas útiles para detectar efectos adversos en anuros antes que estos sean irreversibles en larvas y adultos de anuros.
- III. Los biomarcadores citogenéticos utilizando bioensayos específicos con anuros locales permiten detectar e interpretar el modo de acción de los plaguicidas como IMZT.
- IV. Las respuestas histológicas-fisiológicas en órganos detoxificadores, como el hígado, pueden ser utilizadas como nuevas herramientas de señal temprana para detectar efectos adversos por la acción del herbicida IMZT en larvas y adultos de anuros, corroborando además su importancia como biomarcadores de efecto y exposición.
- V. Finalmente, a partir del análisis multivariado de los biomarcadores en larvas y adultos de anuros, se puede concluir que los puntos finales bioquímicos y citogenéticos propuestos se correlacionan entre sí y con los puntos finales a nivel individual e histológico. A su vez, esto permite estimar una progresión de efectos subletales en niveles crecientes de organización biológica conforme aumenta la concentración de exposición, respuesta que concuerda con el concepto de biomarcadores detallado en el capítulo 1.
- VI. Fundamentado en el concepto anterior, los biomarcadores bioquímicos y citogenéticos empleados en este trabajo a diferentes niveles de organización y de manera integral pueden ser considerados como herramientas válidas de alerta temprana que permitan realizar predicciones sobre efectos letales y subletales irreversibles en futuros estudios ecotoxicológicos así como también pueden ser incorporados en programas de evaluación y monitoreo ambiental en sitios perturbados de forma crónica o constante, con eventos de contaminación accidental o inclusive en procesos de remediación.

5.2.2 Conclusiones particulares

Considerando los resultados obtenidos del trabajo de Tesis Doctoral se considera necesario destacar que:

- I. Analizando de manera comparativa e integral todos los puntos finales evaluados destacamos que *Leptodactylus latinasus* resulta una especie más sensible que *B. pulchella* a IMZT en sus estadios larvales.
- II. Los biomarcadores citogenéticos en anuros son herramientas útiles y válidas en ecotoxicología para evaluar en particular efectos adversos de IMZT en concentraciones subletales y para detectar en general respuestas tempranas luego de la exposición a concentraciones subletales de los estresores ambientales. Además estos biomarcadores son útiles para evaluar efectos a nivel citogenético en especies autóctonas y se consideran válidos para ser incluidos en evaluaciones y monitoreos ambientales al menos de vertebrados acuáticos.
- III. Nuestros estudios soportan la idea propuesta de que el EC es una metodología más sensible que el ensayo de MNs para detectar efectos subletales adversos en daños del ADN por exposición a bajas concentraciones de IMZT. Específicamente, el EC resultó el biomarcador más sensible respondiendo a diferentes tiempos evaluados y en las menores concentraciones ensayadas por lo que también se sugiere como herramienta a emplear en estudios ecotoxicológicos a campo ya que no sólo es más sensible que otras técnicas de genotoxicidad sino que además permite detectar efectos genéticos adversos de forma directa. Curiosamente, hasta el momento el EC en Argentina ha sido escasamente utilizado para evaluar los efectos de los estresores ambientales sobre los anuros.
- IV. Mediante el EC modificado fue posible conocer el modo de acción del herbicida en la cadena de ADN. En particular, se concluye que IMZT causa daño oxidativo en bases púricas del ADN. Sumado a esto, si consideramos la alteración que produce en la actividad de las enzimas antioxidantes tanto en larvas como adultos de ambas especies, podemos concluir que IMZT debería ser considerado como un agente oxidante.
- V. El herbicida IMZT en su formulación comercial Pivot® H resultó un compuesto geno-, cito- y hepatotóxico para larvas y adultos de anuros pampeanos de las especies aquí evaluadas.
- VI. A partir de los parámetros ecotoxicológicos obtenidos en este estudio, como los valores de CL50_{96h}, podemos asegurar que Pivot® H se clasifica como un herbicida tóxico (Categoría II) a muy tóxico (Categoría I) para especies de anuros pampeanas dependiendo la especie considerada.
- VII. Simulando un evento de cese de exposición a los herbicidas, como ocurre en los agroecosistemas pampeanos, se pudo constatar la capacidad de recuperación en larvas por medio de los biomarcadores citogenéticos como herramientas útiles para detectar efectos adversos antes que estos sean irreversibles. No obstante, también se constató que el gasto implicado en los mecanismos de reparación celular para restablecer los parámetros basales

desencadena efectos adversos irreversibles a nivel de individuo como anormalidades morfológicas y en el desarrollo a largo plazo, que puede conducir a situaciones de riesgo poblacional.

- VIII. El herbicida IMZT en una exposición crónica a bajas concentraciones produce efectos adversos a nivel individual y citogenético. Sumado a esto, ambos tipos de biomarcadores son útiles para evaluar los efectos de los estresores ambientales en anuros luego de un evento de exposición crónica.
- IX. Los escenarios de exposición a IMZT utilizados son fácilmente reproducibles y consideran una visión más realista sobre la posible exposición de anfibios adultos a estresores ambientales en los hábitats donde estas especies viven y se reproducen. Además, simulando escenarios de exposición real a herbicidas en la naturaleza se corroboró para anuros pampeanos la utilidad del diseño experimental y que los biomarcadores evaluados son eficientes para estudio en laboratorio e *in situ*.
- X. Se destaca como un punto importante hacer la correlación de biomarcadores a distintos niveles ecológicos dado que nos permiten:
 - ✓ Tener un mejor entendimiento del modo de acción de los estresores ambientales a diferentes niveles de organización biológica,
 - ✓ Conocer que biomarcador implementar según la concentración de exposición al estresor ambiental,
 - ✓ Estudiar la respuesta de las especies de anuros en distintos estadios de vida y
 - ✓ Poder incluir la batería de biomarcadores en programas de evaluación y monitoreo ambiental.

En definitiva, aceptando lo planteado en la hipótesis general, los estudios realizados nos permiten afirmar que el herbicida IMZT introducido directa o indirectamente en los ambientes acuáticos en concentraciones relevantes induce efectos letales y subletales (a nivel individual, histológico, bioquímico y citogenético) tanto en larvas como en ejemplares adultos de *B. pulchella* y *L. latinasus* presentes en agroecosistemas por lo que este herbicida aplicado en los ambientes donde las especies viven y se reproducen podría estar afectando de manera significativa su bienestar y las poblaciones de estos vertebrados.

5.3 Consideraciones finales

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, podemos llegar a las siguientes consideraciones finales:

- I. Las especies utilizadas en este trabajo son importantes modelos de estudio para trabajos ecotoxicológicos dado que son las especies de anuros más abundantes y representativas de los ambientes pampeanos y de los agroecosistemas, sus poblaciones no se encuentran amenazadas, son de fácil mantenimiento y cría en laboratorio y se puede evaluar la respuesta de un estresor ambiental utilizando una batería de biomarcadores a varios niveles

de organización biológica. Además, como mencionaron otros autores, estas especies estudiadas representan buenos modelos de estudio para regiones pampeanas siendo bioindicadoras para evaluar los efectos de los estresores ambientales en los agroecosistemas donde viven.

- II. Se destaca la importancia de evaluar biomarcadores en especies de diferente hábito de vida debido a que exhiben diferentes respuestas a los estresores ambientales. Quedan como preguntas a resolver si estas diferencias observadas en las respuestas pueden deberse a la historia de vida y/o las adaptaciones particulares de las especies a sus ambientes.
- III. Para futuras investigaciones resulta necesario realizar bioensayos que combinen y contemplen la aplicación de diversos biomarcadores que permitan dilucidar el modo de acción de los estresores ambientales antes que los efectos de éstos sean irreversibles y aplicados en las diferentes especies de anuros que habitan diversos ambientes perturbados.
- IV. Los puntos finales utilizados en este estudio a diferentes niveles de organización biológica pueden ser utilizados como biomarcadores de referencia en futuros estudios ecotoxicológicos que evalúen eventuales exposiciones a IMZT y también podrían ser evaluados en otros plaguicidas de amplio uso en regiones pampeanas y sobre especies de anuros locales.

Finalmente, cabe destacar que son necesarios nuevos estudios sobre la toxicidad y las concentraciones de los nuevos herbicidas como IMZT que se aplican en los ecosistemas pampeanos a fin de evaluar no sólo la toxicidad en los vertebrados acuáticos y terrestres sino también para evaluar los peligros para la salud humana. Sólo en el caso particular de IMZT, debido a los escasos estudios disponibles sobre este herbicida en otros organismos así como en el hombre, tanto la U.S. EPA como el Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (Buenos Aires, Argentina), han clasificado al compuesto en sus últimos informes como levemente tóxico. Por su parte, la OMS lo clasificó como ligeramente peligroso (clase III) y para la Superintendencia de Riesgos del Trabajo (Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social) no cumple los criterios para clasificarse en una clase de peligro (Resolución 801/2015). No obstante, en base a las categorizaciones toxicológicas obtenidas en este estudio para anuros, a los efectos ecotoxicológicos reportados en este trabajo y al uso actual de IMZT en la agricultura en formulaciones simples o en mezclas con otros herbicidas se considera que podría estar comprometiendo la salud de los organismos que habitan los ambientes acuáticos así como los seres humanos que directa o indirectamente se encuentran expuestos a las formulaciones comerciales de IMZT. En este sentido, es necesario realizar más estudios ecotoxicológicos utilizando diferentes herramientas de alerta temprana (biomarcadores) para una correcta evaluación toxicológica del principio activo de IMZT y de sus formulaciones comerciales antes que el mismo continúe siendo empleado como herbicida no tóxico en nuestro país.

Bibliografía

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaiee, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor* 10, RA141-RA147.
- Adams, S.M., Ham, K.D., 2011. Application of biochemical and physiological indicators for assessing recovery of fish populations in a disturbed stream. *Environmental Management* 47, 1047-1063.
- Agius, C., 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Developmental & Comparative Immunology* 5, 597-606.
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499-509.
- Agostini, M.G., Kacolicis, F., Demetrio, P., Natale, G.S., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2013. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 104, 163-171.
- Agostini, M.G., Natale, G.S., Ronco, A.E., 2009. Impact of endosulphan and cypermethrin mixture on amphibians under field use for biotech soya bean production. *International Journal of Environment and Health* 3, 379-389.
- Agostini, M.G., Natale, G.S., Ronco, A.E., 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19, 1545-1550.
- Agostini, M.G., Saibene, P.E., Roesler, I., Bilenca, D., 2016. Amphibians of northwestern Buenos Aires province, Argentina: checklist, range extensions and comments on conservation. *Check List* 12, 1998.
- Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Dondo, M., 2009. Expansión de la soja y diversidad de la agricultura en Argentina. *Ecología Austral* 19, 45-54.
- Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* 2, 1-12.
- Aldenberg, T., Jaworska, J.S., 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 1-18.
- Alford, R.A., Richards, S.J., 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 133-165.
- Ali, U., Syed, J.H., Malik, R.N., Katsoyiannis, A., Li, J., Zhang, G., Jones, K.C., 2014. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. *Science of the Total Environment* 476, 705-717.
- Alister, C., Kogan, M., 2005. Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone-resistant maize and their carryover effect on rotational crops. *Crop Protection* 24, 375-379.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment* 15, 87-110.
- Anguiano, O.L., Ferrari, A., Soleno, J., Martinez, M.C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M., Montagna, C.M., 2008. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2117-2123.

- Angulo, A., Rueda-Almonacid, J.V., Rodríguez-Mahecha, J.V., La Marca, E., 2006. Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina, Bogotá D.C.
- Antoniazzi, C.E., López, J.A., Duré, M., Falico, D.A., 2013. Alimentación de dos especies de anfibios (Anura: Hylidae) en la estación de bajas temperaturas y su relación con la acumulación de energía en Santa Fe, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 61.
- APHA, AWWA, WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington DC 20th Edition.
- Arikan, H., Çiçek, K., 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. *North-Western Journal of Zoology* 10, 190-209.
- Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 2011. Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology* 26, 373-381.
- ASIH, 2004. Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, Herpetological Animal Care and Use Committee of the ASIH. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Washington, DC.
- ASTM, 2007. E729 - Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM International, West Conshohocken, PA, USA.
- Attademo, A.M., Bionda, C.L., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Seib, S.N., Basso, A., Junges, C.M., 2014a. Edad, tamaño corporal en la madurez sexual, longevidad y potencial reproductivo de *Leptodactylus latinasus* y *Leptodactylus mystacinus* en un cultivo de soja y un bosque nativo del centro este de Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85, 315-317.
- Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Junges, C. M., Basso, A., 2014b. Biological endpoints, enzyme activities, and blood cell parameters in two anuran tadpole species in rice agroecosystems of mid-eastern Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* 186 (1), 635-649.
- Attademo, A.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Bassó, A., 2011. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology* 20, 274-282.
- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Fiorenza, G., 2007. Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology* 16, 533-539.
- Azqueta, A., Collins, A.R., 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology* 87, 949.
- Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S.A.S., Gaivão, I.O., Collins, A., 2014. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics* 5.
- Bach, N.C., Natale, G.S., Somoza, G.M., Ronco, A.E., 2016. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 23959–23971.
- Baker, N.J., Bancroft, B.A., Garcia, T.S., 2013. A meta-analysis of the effects of pesticides and fertilizers on survival and growth of amphibians. *Science of the Total Environment* 449, 150-156.
- Bale, J.S., Van Lenteren, J.C., Bigler, F., 2008. Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 363, 761-776.

- Bantle, J.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Linder, G., Fort, D.J., 1998. Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX, Oklahoma State Publications Department, Stillwater.
- Bantle, J.A., Rayburn, J.R., Burton, D.T., Turley, S.D., Dawson, D.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Maurice, M.A., Fort, D.J., Linder, G., Buchwalter, D., 1994. Initial interlaboratory validation study of FETAX: phase I testing. *Journal of Applied Toxicology* 14, 213-223.
- Barni, S., Bertone, V., Croce, A.C., Bottiroli, G., Bernini, F., Gerzeli, G., 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy* 195, 19-25.
- Barni, S., Boncompagni, E., Grosso, Bertone, V., Freitas, I., Fasola, M., Fenoglio, C., 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicology* 81, 45-54.
- Basso, N.G., Kehr, A.I., 1991. Postmetamorphic growth and population structure of the frog *Leptodactylus latinasus* (Anura: Leptodactylidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 26, 39-44.
- Bearr, J.S., Stapleton, H.M., Mitchelmore, C.L., 2010. Accumulation and DNA damage in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 2 brominated flame-retardant mixtures, Firemaster 550 and Firemaster BZ-54. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 722-729.
- Beebee, T.J.C., Griffiths, R.A., 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125, 271-285.
- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 11039-11043.
- Bernabò, I., Sperone, E., Tripepi, S., Brunelli, E., 2011. Toxicity of chlorpyrifos to larval *Rana dalmatina*: acute and chronic effects on survival, development, growth and gill apparatus. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61(4), 704-718.
- Bernabò, I., Guardia, A., La Russa, D., Madeo, G., Tripepi, S., Brunelli, E., 2013. Exposure and post-exposure effects of endosulfan on *Bufo bufo* tadpoles: Morpho-histological and ultrastructural study on epidermis and iNOS localization. *Aquatic Toxicology* 142, 164-175.
- Bernabò, I., Guardia, A., Macirella, R., Sesti, S., Crescente, A., Brunelli, E., 2016. Effects of long-term exposure to two fungicides, pyrimethanil and tebuconazole, on survival and life history traits of Italian tree frog (*Hyla intermedia*). *Aquatic Toxicology* 172, 56-66.
- Berrill, M., Bertram, S., Wilson, A., Louis, S., Brigham, D., Stromberg, C., 1993. Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12 (3), 525-539.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463, 33-51.
- Bilenca, D., Codesido, M., González Fisher, C., Pérez Carusi, L., 2009. Impactos de la actividad agropecuaria sobre la biodiversidad en la ecorregión pampeana: impactos de la expansión agrícola y de la intensificación de la agricultura y la ganadería de campo, con algunas recomendaciones de manejo para su mitigación, in: *Agroecosistemas* (Ed.), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Bindraban, P.S., Franke, A.C., Ferraro, D.O., Ghersa, C.M., Lotz, L.A.P., Nepomuceno, A., Smulders, M.J.M., Van de Wiel, C.C.M., 2009. GM-related sustainability: agro-ecological impacts, risk and opportunities of soy production in Argentina and Brazil, *Plant Research International*.

- Blaustein, A.R., Han, B.A., Relyea, R.A., Johnson, P.T.J., Buck, J.C., Gervasi, S.S., Kats, L.B., 2011. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223, 108-119.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Kiesecker, J.M., Hatch, A.C., 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9, 123-140.
- Blaustein, A.R., Wake, D.B., 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5, 203-204.
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543, 251-272.
- Bosch, B., Gorla, N., Aiassa, D., 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 3, 155-163.
- Bridges, C.M., 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 91-96.
- Brechelt, A. 2004. El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Red de Acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAP-AL). Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD. 36p.
- Brodeur, J.C., Candioti, J.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L., Ronco, A.E., 2012. Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology* 46, 72-78.
- Brodeur, J.C., Suarez, R.P., Natale, G.S., Ronco, A.E., Zaccagnini, M.E., 2011. Reduced body condition and enzymatic alterations in frogs inhabiting intensive crop production areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1370-1380.
- Brodeur, J.C., Svartz, G., Perez-Coll, C.S., Marino, D.J.G., Herkovits, J., 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology* 91, 161-170.
- Brodin, M.A., Madhoun, H., Rameswaran, M., Vatnick, I., 2007. Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 80-84.
- Brühl, C.A., Pieper, S., Weber, B., 2011. Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2465-2472.
- Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A., 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline? *Scientific Reports* 3, 1135.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., Tripepi, S., 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91, 135-142.
- Bucke, D., Vethaak, A.D., Lang, A.T., 1992. Quantitative assessment of Melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German. *Marine Ecology Progress Series* 91, 193-196.
- Buikema, A.L., Niederlehner, B.R., Cairns, J., 1982. Biological monitoring part IV—toxicity testing. *Water Research* 16, 239-262.
- Bulaeva, E., Lanctôt, C., Reynolds, L., Trudeau, V.L., Navarro-Martín, L., 2015. Sodium perchlorate disrupts development and affects metamorphosis-and growth-related gene expression in tadpoles of the wood frog (*Lithobates sylvaticus*). *General and Comparative Endocrinology* 222, 33-43.

- Burkhardt, J., Bidwell, J., Fort, D., Sheffield, S., Linder, G., Krest, S.K., Sparling, D.W., 2003. Chemical stressors, in: Linder, G., Krest, S.K., Sparling, D.W. (Eds.), *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*, SETAC, p. 128.
- Burlibasa, L., Gavrilă, L., 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research* 9, 1–15.
- Cabagna, M.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Ale, E., 2006. Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological and Environmental Chemistry* 88, 729–737.
- Cabrera, A.L., Willink, A., 1973. *Biogeografía de América Latina*. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington DC.
- Çakici, Ö., 2015. Histopathologic changes in liver and kidney tissues induced by carbaryl in *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Experimental and Toxicologic Pathology* 67, 237–243.
- Calevro, F., Beyersmann, D., Hartwig, A., 1998. Effect of cadmium(II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles* larvae. *Toxicology Letters* 94, 217–225.
- Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26, 99–103.
- Campbell, T.W., 2015. *Exotic animal hematology and cytology*, Fourth ed. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Canevari, P., Blanco, D.E., Bucher, E.H., Castro, G., Davidson, I., 1999. Humedales de la Argentina: clasificación, situación actual, conservación y legislación. *Wetlands International*.
- Carbajal-López, Y., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Calderón-Segura, M.E., Martínez-Arroyo, A., 2016. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 2513–2520.
- Carey, C., Bryant, C.J., 1995. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental Health Perspectives* 103, 13.
- Carter, A., 2000. How pesticides get into water-and proposed reduction measures. *Pesticide Outlook* 11, 149–156.
- CASAFE, 2013. *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*, in: *Fertilizantes* (Ed.), CASAFE, Buenos Aires.
- Castillo Morales, G., 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas; estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC/IMTA, Mexico.
- Cavaş, T., Ergene-Gözükar, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 81–91.
- Cavaş, T., Ergene-Gözükar, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74, 264–271.
- Çavaş, T., Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268.
- Cei, J.M., 1980. *Amphibians of Argentina*. New Series Monografia, Università degli Studi di Firenze.

- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 277-288.
- Clements, W.H., Newman, M.C., 2003. *Community Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, Ontario, Canada.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Collins, A.R., Azqueta, A., 2012. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research* 736, 122-129.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M., Stetina, R., 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspective* 104, 465-469.
- Collins, J.P., Storfer, A., 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9, 89-98.
- CONICET, 2005. Reference Ethical Framework for Biomedical Research: Ethical Principles for Research with Laboratory, Farm, and Wild Animals, in: CONICET (Ed.).
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12, 12741-12771.
- Corcoran, J., Lange, A., Cumming, R.I., Owen, S.F., Ball, J.S., Tyler, C.R., Winter, M.J., 2014. Bioavailability of the imidazole antifungal agent clotrimazole and its effects on key biotransformation genes in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology* 152, 57-65.
- Couillard, C.M., Hodson, P.V., 1996. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1844-1854.
- Cuevas, M.F., Martori, R., 2007. Diversidad trófica de dos especies sintópicas del género *Leptodactylus* (Anura: Leptodactylidae) del sudeste de la provincia de Córdoba, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 21.
- Chernoff, N., Rogers, J.M., Turner, C.I., Francis, B.M., 1991. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 17, 448-453.
- Chiesa, M.E., Rosenberg, C.E., Fink, N.E., Salibián, A., 2006. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): effects of sublethal lead acetate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 384-391.
- Da Rosa, I., Canavero, A., Maneyro, R., Camargo, A., 2011. Trophic niche variation and individual specialization in *Hypsiboas pulchellus* (Duméril and Bibron, 1841)(Anura, Hylidae) from Uruguay. *South American Journal of Herpetology* 6, 98-106.
- Dahlberg, K., 2012. *Beyond the green revolution: The ecology and politics of global agricultural development*. Springer Science & Business Media.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* 16, 1588-1601.
- De Garady, C.J., Halbrook, R.S., 2006. Using anurans as bioindicators of PCB contaminated streams. *Journal of Herpetology* 40, 127-130.
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423-431.

- del Puerto Rodríguez, A.M., Suárez Tamayo, S., Palacio Estrada, D.E., 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 52, 372-387.
- Demichelis, S.O., De La Torre, F.R., Ferrari, L., Garcia, M.E., Salibian, A., 2001. Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental Monitoring and Assessment* 68, 63-73.
- Denoël, M., D'Hooghe, B., Ficetola, G.F., Brasseur, C., De Pauw, E., Thomé, J.-P., Kestemont, P., 2012. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. *Ecotoxicology* 21, 1240-1250.
- Depledge, M.H., 1996. Genetic ecotoxicology: an overview. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200, 57-66.
- Depledge, M.H., 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research* 399, 109-122.
- Diamond, M.L., de Wit, C.A., Molander, S., Scheringer, M., Backhaus, T., Lohmann, R., Arvidsson, R., Bergman, Å., Hauschild, M., Holoubek, I., 2015. Exploring the planetary boundary for chemical pollution. *Environment International* 78, 8-15.
- Dias Martini, L.F., Mezzomo, R.F., de Avila, L.A., Massey, J.H., Marchesan, E., Zanella, R., Peixoto, S.C., Refatti, J.P., Cassol, G.V., Marques, M., 2013. Imazethapyr and imazapic runoff under continuous and intermittent irrigation of paddy rice. *Agricultural Water Management* 125, 26-34.
- Domijan, A., Zeljezic, D., Kopjar, N., Peraica, M., 2006. Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B1-treated rats. *Toxicology* 222, 53-59.
- Donald, P.F. 2004. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conservation Biology* 18, 17-38.
- Dû-Lacoste, M.L., Akcha, F., Dévier, M.H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 690-707.
- Dumont, J.N., Schultz, T.W., Buchanan, M.V., Kao, G.L., 1983. Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)—A short-term assay applicable to complex environmental mixtures, Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III. Springer, pp. 393-405.
- Duré, M.I., Kehr, A.I., 2004. Influence of microhabitat on the trophic ecology of two leptodactylids from northeastern Argentina. *Herpetologica* 60, 295-303.
- Egea-Serrano, A., Relyea, R.A., Tejedo, M., Torralva, M., 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: A meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2, 1382-1397.
- El-Nahas, A.I., 2000. Mutagenic potential of imazethapyr herbicide (Pursuit) on *Vicia faba* in the presence of urea fertilizer. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3, 900-905.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Etchegoyen, M.A., Ronco, A.E., Almada, P., Abelando, M., Marino, D.J., 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental Monitoring and Assessment* 189, 63.
- Evenson, R.E., Gollin, D., 2003. Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300, 758-762.
- Ezemonye, L.I.N., Ilechie, I. 2007. Acute and chronic effects of organophosphate pesticides (Basudin) to amphibian tadpoles (*Ptychadena bibroni*). *African Journal of Biotechnology* 6 (13), 1554-1558

- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research* 161, 193-198.
- Fenoglio, C., Boncompagni, E., Fasola, M., Gandini, C., Comizzoli, S., Milanesi, G., Barni, S., 2005. Effects of environmental pollution on the liver parenchymal cells and Kupffer-melanomacrophagic cells of the frog *Rana esculenta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 259-268.
- Fernando, V.A., Weerasena, J., Lakraj, G.P., Perera, I.C., Dangalle, C.D., Handunnetti, S., Premawansa, S., Wijesinghe, M.R., 2016. Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. *Aquatic Toxicology* 177, 98-105.
- Ferrari, A., Lascano, C., de D'Angelo, A. M. P., & Venturino, A., 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153 (1), 34-39.
- Ferrari, A., Anguiano, L., Lascano, C., Sotomayor, V., Rosenbaum, E., Venturino, A., 2008. Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: Differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 22, 259-267.
- Ferrari, A., Anguiano, O.L., Soleño, J., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M., 2004. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139, 239-243.
- Ferrari, L., De la Torre, F.R., Demichelis, S.O., García, M.E., Salibián, A., 2005. Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay. *Chemosphere* 59, 567-575.
- Ferrari, L., Demichelis, S.O., García, M.E., De la Torre, F.R., Salibián, A., 1997. Premetamorphic anuran tadpoles as test organism for an acute aquatic toxicity assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 117-121.
- Fiedler, P.L., 1992. *Conservation biology: the theory and practice of nature conservation preservation and management*, First edition ed. Springer Science & Business Media, New York, United State.
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, London. 333p.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272-280.
- Fragiorge, E.J., de Rezende, A.A.A., Graf, U., Spanó, M.A., 2008. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology* 46, 393-401.
- Franco-Belussi, L., de Lauro Castrucci, A.M., de Oliveira, C., 2013. Responses of melanocytes and melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura: Leiuperidae) to Nle 4, D-Phe 7- α -melanocyte stimulating hormone and lipopolysaccharides. *Zoology* 116, 316-324.
- Franco-Belussi, L., Sköld, H.N., de Oliveira, C., 2016. Internal pigment cells respond to external UV radiation in frogs. *Journal of Experimental Biology* 219, 1378-1383.
- Frangioni, G., Borgioli, G., Bianchi, S., Pillozzi, S., 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. *Journal of Experimental Zoology* 287, 120-127.

- Freedman, B., 1995. Environmental Ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses, Second Edition ed. Academic Press, California, United States.
- Freeman, J.L., Rayburn, A.L., 2005. Developmental impact of atrazine on metamorphosing *Xenopus laevis* as revealed by nuclear analysis and morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (7), 1648-1653.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681, 80-92.
- Gagnon, C., Saulnier, I., 2003. Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent. *Environmental Pollution* 124, 47-55.
- Gallardo, J.M., 1987. Anfibios Argentinos: Guía para su identificación. Librería Agropecuaria. Buenos Aires.
- Garber, J.C., Barbee, R.W., Bielitzki, J.T., 2011. Guide for the care and use of laboratory animals. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press.
- Gaudet-Hull, A.M., Rayburn, J.R., Bantle, J.A., Burton, D.T., Turley, S.D., Dawson, D.A., Dumont, J.N., Finch, R.A., Maurice, M.A., Fort, D.J., Linder, G., Buchwalter, D., 1994. FETAX interlaboratory validation study: Phase II testing. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1629-1637.
- Gavrilescu, M., 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5, 497.
- Gedik, C.M., Collins, A.R., 2005. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *The FASEB Journal* 19, 82-84.
- Gerhardt, A., 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental Monitoring*, 1, 77-123.
- Gilliom, R.J., Barbash, J.E., Crawford, C.G., Hamilton, P.A., Martin, J.D., Nakagaki, N., Nowell, L.H., Scott, J.C., Stackelberg, P.E., Thelin, G.P., 2006. Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992-2001. US Geological Survey.
- Ghersa, C.M., Martinez-Ghersa, M.A. 1991. Cambios ecológicos en los agroecosistemas de la Pampa Ondulada. Efectos de la introducción de la soja. *Ciencia e Investigación* 5, 182-188.
- Ghersa, C.M., Martinez-Ghersa, M.A. 2000. Ecological correlates of weed seed size and persistence in the soil under different tilling systems: implications for weed management. *Field Crops Research* 67, 141-148.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 183-190.
- Grazia-Andreassi, M., Cioppa, A., Manfredi, S., Palmieri, C., Botto, N., & Picano, E., 2007. Acute chromosomal DNA damage in human lymphocytes after radiation exposure in invasive cardiovascular procedures. *European Heart Journal*, 28(18), 2195-2199.
- Gregoire, C., Elsaesser, D., Huguenot, D., Lange, J., Lebeau, T., Merli, A., Mose, R., Passeport, E., Payraudeau, S., Schütz, T., 2009. Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters* 7, 205-231.
- Greulich, K., Pflugmacher, S., 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65, 329-336.
- Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 518, 145-150.

- Grung, M., Lin, Y., Zhang, H., Steen, A.O., Huang, J., Zhang, G., Larssen, T., 2015. Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China—A review. *Environment International* 81, 87-97.
- Guerra, C., Aráoz, E., 2016. Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 121, 105-116.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of RoundUp® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381-1390.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Pacheco, M., 2014. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? *Aquatic Toxicology* 155, 213-221.
- Gupta, G., Bhattacharya, A.K., 2008. Assessing toxicity of post-emergence herbicides to the *Spilarctia obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Pest Science* 81, 9-15.
- Gupta, R.C., 2014. *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press.
- Gürkan, M., Hayrettaş, S., 2012. Morphological and histological effects of copper sulfate on the larval development of green toad, *Bufo viridis*. *Turkish Journal of Zoology* 36, 231-240.
- Guttman, S.I., 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102, 97.
- Guzmán-Guillén, R., Prieto, A.I., Moreno, I., Ríos, V., Vasconcelos, V., Cameán, A.M., 2014. Effects of depuration on oxidative biomarkers in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after subchronic exposure to cyanobacterium producing cylindrospermopsin. *Aquatic Toxicology* 149, 40-49.
- Hall, R.J., Henry, P.F.P., 1992. Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetological Journal* 2, 65-71.
- Hallenbeck, W.H., Cunningham-Burns, K.M., 2012. *Pesticides and Human Health*. Springer Science & Business Media.
- Hallwell, B., 2000. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *American Journal of Clinical Nutrition* 72 (5): 1082-1087.
- Hammond, J.I., Jones, D.K., Stephens, P.R., Relyea, R.A., 2012. Phylogeny meets ecotoxicology: evolutionary patterns of sensitivity to a common insecticide. *Evolutionary Applications* 5 (6), 593-606.
- Hamza-Chaffai, A., 2014. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 3, 19.
- Harris, M.L., Chora, L., Bishop, C.A., Bogart, J.P., 2000. Species- and Age-Related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 263-270.
- He, J.L., Chen, W.L., Jin, L.F., Jin, H.Y., 2000. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Research* 20, 223-231.
- Herkovits, J., Helguero, L.A., 1998. Copper toxicity and copper-zinc interactions in amphibian embryos. *Science of the Total Environment* 221, 1-10.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C.S., 2003. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos, Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations. ASTM International.

- Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 1993. Stage dependent susceptibility of *Bufo arenarum* embryos to cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 608-611.
- Herkovits, J., Perez-Coll, C.S., Herkovits, F.D., 2002. Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Environmental Pollution* 116, 177-183.
- Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O., 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* 307, 136-145.
- Heyer, W.R., Donnelly, M.A., McDiarmid, R.W., Hayek, L.C., Foster, M.S., 1994. *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians*. Washington, DC, Smithsonian Institution Press.
- Holvoet, K.M.A., Seuntjens, P., Vanrolleghem, P.A., 2007. Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecological Modelling* 209, 53-64.
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404, 752-755.
- Howe, C.M., Berril, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (8): 1929-1938.
- IARC, 1976. Some carbamates, thiocarbamates and carbazides, in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- IARC, 1977. Some Fumigants, the Herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, Chlorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals, in: ONU, O.M.S. (Ed.), pp. 111-148.
- IARC, 1986. Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures, in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- IARC, 1987a. Genetic and related effects: an updating of selected IARC monographs in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- IARC, 1987b. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- IARC, 1991. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides, International in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- IARC, 2015. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides, in: ONU, O.M.S. (Ed.), Lyon.
- INTA, 2008. *Guía para cuidado y uso de animales para experimentación*. Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Republica Argentina.
- IUCN, 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-1. <<http://www.iucnredlist.org/>> Visitado el 12 Mayo 2017.
- James, C. 2011. Global status of commercialized Biotech/GM crops: 2011. *ISAAA Briefs* 43, 338p.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Joensen, L., Semino, S., Paul, H., 2005. *Argentina: A case study on the impact of genetically engineered soya*. The Gaia Foundation, London, UK.
- Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A., 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1939–1945

- Jordanova, M., Miteva, N., Rocha, E., 2008. A qualitative and quantitative study of the hepatic pigmented macrophage aggregates during the breeding cycle of ohrid trout, *Salmo letnica* Kar.(Teleostei, Salmonidae). *Microscopy Research and Technique* 71, 822-830.
- Josende, M.E., Tozetti, A.M., Alalan, M.T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F.M.R., Martins, S.E., 2015. Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators* 49, 83-87.
- Junges, C.M., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Bassó, A., 2010. Predator-prey interactions between *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae) and *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Amphibia: Hylidae): Importance of lateral line in nocturnal predation and effects of fenitrothion exposure. *Chemosphere* 81, 1233-1238.
- Kareiva, P., Watts, S., McDonald, R., Boucher, T. 2007. Domesticated nature: shaping landscapes and ecosystems for human welfare. *Science* 316, 1866-1869.
- Kaur, R., Dua, A., 2016. Fish liver and gill cells as cytogenotoxic indicators in assessment of water quality. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 18892-18900
- Kawai, K., Kaku, K., Izawa, N., Shimizu, T., Fukuda, A., Tanaka, Y., 2007. A novel mutant acetolactate synthase gene from rice cells, which confers resistance to ALS-inhibiting herbicides. *Journal of Pesticide Science* 32, 89-98.
- Kawanishi, C.Y., Hartig, P., Bobseine, K.L., Schmid, J., Cardon, M., Massenburg, G., Chernoff, N., 2003. Axial skeletal and Hox expression domain alterations induced by retinoic acid, valproic acid, and bromoxynil during murine development. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 17, 346-356.
- Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme, S., Choi, A.H., 2016. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network. PAN Pesticide Database website, Oakland, CA. <<http://www.pesticideinfo.org>>
- Kehr, A.I., 1987. Crecimiento individual de larvas de *Hyla pulchella pulchella* y *Bufo fernandezae* en condiciones controladas de coexistencia y densidad (Amphibia: anura). *Cuadernos de Herpetología* 3.
- Kehr, A.I., 1989. Factores dependientes de la densidad y su influencia sobre el crecimiento individual de los estados larvales de *Hyla pulchella pulchella* (Amphibia: Anura). *Limnobiós* 2, 757-761.
- Kendall, R.J., Lacher, T.E., Cobb, G.P., Cox, S.B., 2010. *Wildlife Toxicology: Emerging Contaminant and Biodiversity Issues*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Khan, M.Z., Law, F.C., 2005. Adverse effects of pesticides and related chemicals on enzyme and hormone systems of fish, amphibians and reptiles: a review. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* 42, 315-323.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Belden, L.K., 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410, 681-684.
- Kim, K., Kabir, E., Jahan, S.A., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* 575, 525-535.
- Knaak, J.B., Tan, C., Dary, C.C., 2011. Pesticide regulations: exposure-dose modeling from FIFRA to FQPA. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 112, 117-162.
- Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759-765.
- Kranz, H., 1989. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 6, 167-173.

- Krausz, R.F., Kapusta, G., 1998. Total postemergence weed control in imidazolinone-resistant corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 151-156.
- Kushwaha, S., Vikram, A., Trivedi, P.P., Jena, G.B., 2011. Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research* 726, 242-250.
- Kwet, A., Aquino, L., Lavilla, E., di Tada, I., 2004. *Hypsiboas pulchellus*, Red List of Threatened Species. International Union for Conservation of Nature. Version 2012.2., International Union for Conservation of Nature. Version 2012.2.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A.A., Wantzen, M., da Silva, C.J., Zech, W., 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *Journal of Environmental Quality* 31, 1636-1648.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna-Zenklusen, M.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Bassó, A., Lorenzatti, E., 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research* 769, 7-12.
- Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., Attademo, A.M., 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research* 587, 67-72.
- Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Junges, C.M., 2012. Los agroquímicos y su impacto en los anfibios: un dilema de difícil solución. *Química Viva* 11, 184-198.
- Lajmanovich, R. C., Peltzer, P. M., Junges, C. M., Attademo, A. M., Sanchez, L. C., Bassó, A., 2010. Activity levels of B-esterases in the tadpoles of 11 species of frogs in the middle Paraná River floodplain: implication for ecological risk assessment of soybean crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (7), 1517-1524
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Grenón, P., Cabagna-Zenklusen, M.C. 2015. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, & Soil Pollution* 226:427.
- Lannoo, M., 2008. Malformed frogs: The collapse of aquatic ecosystems. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Lapworth, D.J., Baran, N., Stuart, M.E., Ward, R.S., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution* 163, 287-303.
- Lascano, C.I., Ferrari, A., Gauna, L.E., Cocca, C., Cochón, A.C., Verrengia, N., Venturino, A., 2011. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 240-247.
- Lavorato, M., Bernabò, I., Crescente, A., Denoël, M., Tripepi, S., Brunelli, E., 2013. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64 (2), 253-262
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544, 43-64.
- Leguizamón, A. 2014. Modifying Argentina: GM soy and socio-environmental change. *Geoforum* 53, 149-160.
- Lewis, P.A., Klemm, D.J., Lazorchak, J.M., Norberg-King, T.J., Peltier, W.H., Heber, M.A., 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory.

- Liman, R., Ciğerci, İ.H., Öztürk, N.S., 2015. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 118, 38-42.
- Lin, K., Xu, C., Zhou, S., Liu, W., Gan, J., 2007. Enantiomeric separation of imidazolinone herbicides using chiral high-performance liquid chromatography. *Chirality* 19, 171-178.
- Linder, G., Grillitsch, B., 2000. *Ecotoxicology of metals*. SETAC, Pensacola, FL, USA.
- Liu, G.X., 2011. Application of open source software Image-J in microscopic movement tracking: movement track reconstruction and parameter algorithms. *Applied Mechanics and Materials* 66, 827-832.
- Liu, W.Y., Wang, C.Y., Wang, T.S., Fellers, G.M., Lai, B.C., Kam, Y.C., 2011. Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. *Ecotoxicology* 20 (2), 377-384.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., Ternes, T.A., 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science & Technology* 39, 5209-5218.
- Longnecker, M.P., Rogan, W.J., Lucier, G., 1997. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health 1. *Annual Review of Public Health* 18, 211-244.
- López, J.A., Scarabotti, P.A., Ghirardi, R., 2015. Amphibian trophic ecology in increasingly human-altered wetlands. *Herpetological Conservation and Biology* 10, 819-832.
- López, S.L., Aiassa, D., Benítez-Leite, S., Lajmanovich, R., Manas, F., Poletta, G., Sánchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco, A.E., 2012. Pesticides used in South American GMO-based agriculture: A review of their effects on humans and animal models. *Advances in Molecular Toxicology* 6, 41-75.
- Losi-Guembarovski, R., Santos, F.V., Dias, F.L., Frederico, R.G., Cólus, I.M.S., 2004. Assessment of the ability of Imazaquin herbicide to induce chromosomal aberrations in vitro in cultured Chinese hamster ovary cells and micronuclei in vivo in mice. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1245-1249.
- Loumbourdis, N.S., Vogiatzis, A.K., 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 52-58.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 473, 619-641.
- MacBean, C., 2012. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, Hampshire, United Kingdom.
- Magdaleno, A., Gavensky, M.P., Fassiano, A.V., Ríos de Molina, M.C., Santos, M., March, H., Moretton, J., Juárez, Á.B., 2015. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 19194-19202.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 193-199.

- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P., 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157, 2903-2927.
- Maragno, F.P., Santos, T.G., Cechin, S.Z., 2013. The role of phytophysiognomies and seasonality on the structure of ground-dwelling anuran (Amphibia) in the Pampa biome, southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85, 1105-1116.
- Marchiori, A., Baumart, J., Santos, S., 2012. Immatures of Chironomidae (Insecta–Diptera) under the action of pesticides in irrigated rice field. *Ecohydrology & Hydrobiology* 12, 43-52.
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., Jolliet, O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 93, 379-392.
- Marques, S.M., Antunes, S.C., Pissarra, H., Pereira, M.L., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology* 91, 187-195.
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2014. Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods—Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology* 166, 126–133.
- Marquis, O., Miaud, C., Ficetola, G.F., Bocher, A., Mouchet, F., Guittonneau, S., Devaux, A., 2009. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquatic Toxicology* 95, 152-161.
- Maselli, V., Polese, G., Rippa, D., Ligrone, R., Rastogi, R.K., Fulgione, D., 2010. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring provinces. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1525–1529.
- Masters, R.A., Nissen, S.J., Gaussoin, R.E., Beran, D.D., Stougaard, R.N., 1996. Imidazolinone herbicides improve restoration of Great Plains grasslands. *Weed Technology*, 392-403.
- Mattice, J.D., Smartt, A., Scott, T., Norman, R.J., 2012. Environmental implications of pesticides in rice production. In: Norman, R.J., Moldenhauer, K.A.K. (Eds.), *Rice Research Studies 2011*. Arkansas Agricultural Experiment Station, University of Arkansas System Division of Agriculture, Fayetteville, Arkansas, pp. 165–175.
- Matson, C.W., Gillespie, A.M., McCarthy, C., McDonald, T.J., Bickham, J.W., Sullivan, R., Donnelly, K.C., 2009. Wildlife toxicology: biomarkers of genotoxic exposures at a hazardous waste site. *Ecotoxicology* 18, 886-898.
- Mattison, C., 1987. *Care of reptiles and amphibians in captivity*. Blandford Press.
- Mazzatorta, P., Benfenati, E., Neagu, D., Gini, G. 2002. The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* 42, 1250–1255.
- McDiarmid, R.W., Altig, R., 1999. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. University of Chicago Press.
- McLaughlin, A., Mineau, P., 1995. The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 55, 201-212.
- McMahon, T.A., Halstead, N.T., Johnson, S., Raffel, T.R., Romansic, J.M., Crumrine, P.W., Rohr, J.R., 2012. Fungicide-induced declines of freshwater biodiversity modify ecosystem functions and services. *Ecology Letters* 15, 714-722.
- Medina, R.G., Ponssa, M.L., Araújo, E., 2016. Environmental, land cover and land use constraints on the distributional patterns of anurans: *Leptodactylus* species (Anura, Leptodactylidae) from Dry Chaco. *PeerJ* 4, e2605.

- Melancon, M.J., Alscher, R., Benson, W., Kruzynski, G., Lee, R.F., Sikka, H.C., Spies, R.B., 1992. Metabolic products as biomarkers, in: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 87-124.
- Meteyer, C.U., 2000. Field guide to malformations of frogs and toads: with radiographic interpretations. US Fish and Wildlife Service.
- Michel, C., Vincent-Hubert, F., 2015. DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo (a) pyrene. *Ecotoxicology* 24, 2009–2016.
- Migliore, L., Coppede, F., Fenech, M., Thomas, P., 2011. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* 26 (1): 85–92.
- Mikloš, M., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, 2009. Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiology and Oncology* 43, 97-107.
- Mineau, P., 2005. A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of “long term” pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. *Ecotoxicology* 14, 775-799.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A.K., Mohanty, S., Dutta, S.K., 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20, 283-292.
- Moraes, B.S., Clasen, B., Loro, V.L., Pretto, A., Toni, C., de Avila, L.A., Marchesan, E., de Oliveira Machado, S.L., Zanella, R., Reimche, G.B., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 328-335.
- Morales, C., Shaper, M., 2004. Las nuevas fronteras tecnológicas: los transgénicos y sus impactos en América Latina y el Caribe. Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto. Comisión Económica para América Latina y el Caribe, Santiago de Chile, 191.
- Moreira, L.F.B., Moura, R.G., Maltchik, L., 2015. Stop and ask for directions: factors affecting anuran detection and occupancy in Pampa farmland ponds. *Ecological Research* 31, 65-74.
- Moresco, R.M., De Oliveira, C., 2009. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South American Journal of Herpetology* 4, 1-8.
- Morínigo Egusquiza, G.M., 2016. *Ecotoxicología en anfibios: un análisis cuantitativo*, Instituto Latino-Americano de Ciencias de la vida y de la naturaleza. UNILA, Foz de Iguazú, Paraná.
- Morse, H.R., Jones, N.J., Peltonen, K., Harvey, R.G., Waters, R., 1996. The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo [a] pyrene in developing *Xenopus laevis* larvae. *Mutagenesis* 11, 101–109.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268, 157-177.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environmental Toxicology* 22, 422–435.
- Mouchet, F., Teaniniuraitemoana, V., Baudrimont, M., Daffe, G., Gauthier, L., Gonzalez, P., 2015. Recovery capabilities of *Xenopus laevis* after exposure to Cadmium and Zinc. *Chemosphere* 139, 117-125.
- Mudry, M.D., Carballo, M.A., 2006. *Genética Toxicológica*, Buenos Aires, Argentina.

- Murussi, C.R., Costa, M.D., Leitemperger, J.W., Guerra, L., Rodrigues, C.C.R., Menezes, C.C., Severo, E.S., Flores-Lopes, F., Salbego, J., Loro, V.L., 2015. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 445-455.
- Nace, G.W., 1977. Breeding amphibians in captivity. *International Zoo Yearbook* 17, 44-50.
- Natale, G.S., 2006. Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, p. 300.
- Natale, G.S., Ammassari, L.L., Basso, N.G., Ronco, A.E., 2006. Acute and chronic effects of Cr (VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 261-267.
- Natale, G.S., Basso, N.G., Ronco, A.E., 2000. Effect of Cr (VI) on early life stages of three species of hylid frogs (Amphibia, Anura) from South America. *Environmental Toxicology* 15, 509-512.
- Navarro-Martín, L., Lanctôt, C., Jackman, P., Park, B. J., Doe, K., Pauli, B. D., Trudeau, V. L., 2014. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development, growth and sex ratios of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*) tadpoles. I: Chronic laboratory exposures to VisionMax®. *Aquatic Toxicology* 154, 278-290
- Netting, J., 2000. Pesticides implicated in declining frog numbers. *Nature* 408, 760-760.
- Newman, M.C., 2014. Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution. CRC press, Boca Ratón, Florida.
- Newman, M.C., Clements, W.H., 2008. Ecotoxicology: A comprehensive treatment. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation Twin Pack Gold® in human hepatoma (HepG2) cells. *Food and Chemical Toxicology* 62, 777-781.
- Nikoloff, N., Larramendy, M.L., Soloneski, S., 2014a. Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure. *Food and Chemical Toxicology* 65, 233-241.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014b. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 275-281.
- Obschatko, E.S. 1988. La transformación económica y tecnológica de la agricultura pampeana, 1950-1984. Ediciones Culturales Argentinas, Ministerio de Educación y Justicia de la Nación, Secretaría de Cultura. 192p.
- O'Neil, M.J., 2013. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. RSC Publishing, Whitehouse Station, NJ.
- OECD, 2009. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. The Amphibian Metamorphosis Assay, in: OECD (Ed.), 231, p. 33.
- ONU. 2011. Peligros para el medioambiente, Naciones Unidas Parte 4, pp.229–258
- Ossana, N.A., Castañé, P.M., Salibián, A., 2013. Use of *Lithobates catesbeianus* tadpoles in a multiple biomarker approach for the assessment of water quality of the Reconquista river (Argentina). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 486-497.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.

- Pasha, F., 2013. Enzyme Inhibition (AChE) in Brain of *Oreochromis mossambicus* due to Pesticidal Pollution of Herbicide Pursuit. *Journal of Biological Sciences* 1, 91-100.
- Pasha, F., Singh, R., 2005. Enzyme inhibition (AChE) in muscles and skin of *Oreochromis mossambicus* due to pesticidal pollution of herbicide Pursuit. *Asian Journal of Experimental Sciences* 19, 119-126.
- Passarelli, L.M., Roller, C.H., Ciciarelli, M.M., Dedomenici, A.C., González, G., 2014. Flora vascular de humedales permanentes y transitorios bonaerenses (Buenos Aires, Argentina). *Botanica Complutensis* 38, 139-154.
- Paunescu, A., Ponopal, C.M., Drghici, O., Marinescu, A.G., 2010. Liver histopathologic alterations in the frog *Rana (Pelophylax) ridibunda* induce by the action of reldan 40EC insecticide. *An UO Fasc Biol* 17, 166-169.
- Pazini, J., Pasini, R.A., Rakes, M., de Armas, F.S., Seidel, E.J., da S Martins, J.F., Grützmacher, A.D., 2017. Toxicity of pesticide tank mixtures from rice crops against *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Platygasteridae). *Neotropical Entomology*, 1-10.
- Peluso, F., González Castelain, J., Varela, C., Usunoff, E., 2008. Evaluación preliminar de riesgo sanitario por agroquímicos en aguas del arroyo Azul. *Prov. Buenos Aires. Biología Acuática* 24, 123-130.
- Peltzer, P.M., Junges, C.M., Attademo, A.M., Bassó, A., Grenón, P., Lajmanovich, R.C., 2013a. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology* 22, 1165-1173.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Cabagna-Zenkhusen, M.C., Repetti, M.R., Sigrist, M.E., Beldoménico, H., 2013b. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 142-151.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernández, J.C., Cabagna, M.C., Attademo, A.M., Bassó, A., 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 185-197.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Sanchez, L.C., Attademo, A.M., Junges, C.M., Bionda, C.L., Martino, A., Basso, A., 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology* 6, 432-442.
- Pengue, W.A. 2005. Agricultura industrial y transnacionalización en América Latina: la transgénesis de un continente? Universidad de Buenos Aires. 221p.
- Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J., Salibián, A., 1988. Embryotoxicity of lead on *Bufo arenarum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 247-252.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 120-126.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., Natale, G.S., 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 9852-9861.
- Pickford, G.E., 1953. Fish endocrinology. Peabody Museum of Natural History.
- Pimentel, D., 1971. Ecological effects of pesticides on non-target species, US Government Office of Science and Technology. Cornell University, Ithaca, New York, p. 220.

- Pingali, P.L. 2012. Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109,12302-12308.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, A.A., Anderson, D., 1999a. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research* 440, 195-204.
- Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., Marcos, R., 1999b. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research* 441, 115-127.
- Pollution and Water Quality, 2017. Croll Corner - Aquatic Science site. < <https://sites.google.com/a/staff.lisd.net/crollcorner/disruption-of-systems-human-impact/pollution-and-its-indicators>> Visitado el 30 Marzo 2017.
- Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez A.M., Salazar, A.M., Ramírez-Noguera, P., Ángeles, E., Alba-Hurtado, F., 2016. Genotoxicity and cytotoxicity assessment of new ethyl-carbamates with ixodical activity. *Mutation Research* 807, 8-14.
- Qian, H., Li, Y., Sun, C., Lavoie, M., Xie, J., Bai, X., Fu, Z., 2015. Trace concentrations of imazethapyr (IM) affect floral organs development and reproduction in *Arabidopsis thaliana*: IM-induced inhibition of key genes regulating anther and pollen biosynthesis. *Ecotoxicology* 24, 163-171.
- Quaranta, A., Bellantuono, V., Cassano, G., Lippe, C., 2009. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobiotics. *PLoS One* 4, e7699.
- Ralph, S., Petras, M., 1998. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutation Research* 413, 235-250.
- Reboratti, C. 2010. Un mar de soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande*, 63-76.
- Reimche, G.B., Machado, S.L.O., Oliveira, M.A., Zanella, R., Dressler, V.L., Flores, E.M.M., Gonçalves, F.F., Donato, F.F., Nunes, M.A.G., 2015. Imazethapyr and imazapic, bispyribac-sodium and penoxsulam: Zooplankton and dissipation in subtropical rice paddy water. *Science of the Total Environment* 514, 68-76.
- Relyea, R.A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15, 618-627.
- Relyea, R.A., Schoeppner, N.M., Hoverman, J.T., 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications* 15, 1125-1134.
- Ritter, W.F., Shirmohammadi, A., 2000. *Agricultural nonpoint source pollution: watershed management and hydrology*. CRC Press, Boca Ratón.
- Robinson, S.A., Richardson, S.D., Dalton, R.L., Maisonneuve, F., Trudeau, V.L., Pauli, B.D., Lee-Jenkins, S.S. 2017. Sublethal effects on wood frogs chronically exposed to environmentally relevant concentrations of two neonicotinoid insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36 (4), 1101-1109
- Rohr, J.R., Elskus, A.A., Shepherd, B.S., Crowley, P.H., McCarthy, T.M., Niedzwiecki, J.H., Sager, T., Sih, A., Palmer, B.D., 2003. Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the streamside salamander (*Ambystoma barbouri*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (10), 2385-2392.

- Rohr, J.R., Crumrine, P.W., 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15, 1135-1147.
- Rosenbaum, E.A., Duboscq, L., Soleño, J., Montagna, C.M., Ferrari, A., Venturino, A., 2012. Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2311-2317.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45, 632-639.
- Ruiz de Arcaute, C., Salgado Costa, C., Demetrio, P.M., Natale, G.S., Ronco, A.E., 2012. Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 21, 2338-2348.
- Rund, C.R., Christiansen, J.L., Johnson, J.C., 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research* 11, 114-119.
- Salibián, A., 1992. Effects of deltamethrin on the South American toad, *Bufo arenarum*, tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 616-621.
- Sánchez-Bain, A., Forget, G., Feola, G., Ronco, A., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. CIID, Ottawa, ON, CA.
- Sanchez, L.C., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Manzano, A.S., Junges, C.M., Attademo, A.M., 2013. Reproductive activity of anurans in a dominant agricultural landscape from central-eastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84, 912-926.
- Sanders, H.O., 1970. Pesticide toxicities to tadpoles of the western chorus frog *Pseudacris triseriata* and Fowler's toad *Bufo woodhousii fowleri*. *Copeia* 2, 246-251.
- Santos, L.R.S., Franco-Belussi, L., Zieri, R., Borges, R.E., de Oliveira, C., 2014. Effects of thermal stress on hepatic melanomacrophages of *Eupemphix nattereri* (Anura). *The Anatomical Record* 297, 864-875.
- Satorre, E.H. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura Argentina actual. *Ciencia Hoy* 15, 24-31.
- Schulte-Hostedde, A.I., Zinner, B., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86, 155-163.
- Senseman, S.A., 2007. *Herbicide Handbook*, 9 ed. Weed Science Society of America.
- Shaffer, H.B., Gidiş, M., McCartney-Melstad, E., Neal, K.M., Oyamaguchi, H.M., Tellez, M., Toffelmier, E.M., 2015. Conservation genetics and genomics of amphibians and reptiles. *Annual Review of Animal Biosciences* 3, 113-138.
- Shiva, V., 1993. *The violence of the green revolution: Third world agriculture, ecology, and politics*. University Press of Kentucky, Penang, Malaysia.
- Shugart, L.R., Theodorakis, C.W., Bickham, A.M., Bickham, J.W., 2002. Genetic effects of contaminant exposure and potential impacts on animal populations, *Handbook of Ecotoxicology*, Second Edition. CRC Press.
- Shuman-Goodier, M.E., Propper, C.R., 2016. A meta-analysis synthesizing the effects of pesticides on swim speed and activity of aquatic vertebrates. *Science of the Total Environment* 565, 758-766.

- Sichel, G., Scalia, M., Corsaro, C., 2002. Amphibia kupffer cells. *Microscopy Research and Technique* 57, 477-490.
- Simonich, S.L., Hites, R.A., 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science* 269, 1851.
- Simoniello, M.F., Kleinsorge, E.C., Scagnetti, J.A., Grigolato, R.A., Poletta, G.L., Carballo, M.A., 2008. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *Journal of Applied Toxicology* 28, 957-965.
- Simoniello, M.F., Kleinsorge, E.C., Scagnetti, J.A., Mastandrea, C., Grigolato, R.A., Paonessa, A.M., Carballo, M.A., 2010. Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* 15, 52-60.
- Smith, C.C., O'Donovan, M.R., Martin, E.A., 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDIII. *Mutagenesis* 21, 185-190.
- Smrcek, J.C., Clements, R., Morcock, R., Robert, W. 1993. Assessing ecological hazards under TSCA: methods and evaluation of data. In: Landis, W.A., Hughes, J. S., Landis, M.A. (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment*. ASTM STP 1179. ASTM, Philadelphia
- Singh, N.P., 1996. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells, *Technologies for detection of DNA damage and mutations*. Springer, pp. 3-24.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Singh, N.P., Tice, R.R., Stephens, R.E., Schneider, E.L., 1991. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research* 252, 289-296.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2007. Herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes. *Cell Biology International* 31, 1316-1322.
- Soloneski, S., Nikoloff, N., Larramendy, M.L. 2016. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulation: EndoIII and Fpg alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 10292-10300.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Larramendy, M.L., 2017. Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and FPG alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 10292-10300.
- Souza Caldas, S., Zanella, R., Primel, E.G., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticides in the South of Brazil. In: Kortekamp, A. (Ed.), *Herbic. Environ. InTech*, Rijeka, pp. 471-492
- Sparling, D.W., Bishop, C.A., Linder, G., 2000. The current status of amphibian and reptile ecotoxicological research, in: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A. (Eds.), *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, p. 13.
- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K., 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Books, Boca Raton, FL.
- Staniszewski, M., 1995. *Amphibians in captivity*. TFH.
- Stankevičiūtė, M., Butrimavičienė, L., Valskienė, R., Greiciūnaitė, J., Baršienė, J., Vosylienė, M.Z., Svecevičius, G., 2016. Analysis of nuclear abnormalities in erythrocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with Cu and Zn and after 4-, 8-, and 12-day depuration (post-treatment recovery). *Mutation Research* 797, 26-35

- Stark, J.D., Banks, J.E., 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology* 48, 505-519.
- Stark, J.D., Chen, X.D., Johnson, C.S., 2012. Effects of herbicides on Behr's metalmark butterfly, a surrogate species for the endangered butterfly, Lange's metalmark. *Environmental Pollution* 164, 24-27.
- Stebbins, R.C., Cohen, N.W., 1995. A natural history of amphibians. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Suárez, R.P., Zaccagnini, M.E., Babbitt, K.J., Calamari, N.C., Natale, G.S., Cerezo, A., Codugnello, N., Boca, T., Damonte, M.J., Vera-Candioti, J., 2016. Anuran responses to spatial patterns of agricultural landscapes in Argentina. *Landscape Ecology* 31, 2485-2505.
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., Shaner, D.L., 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61, 246-257.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292, 281-284.
- Torres, D., Capote, T. 2004. Agroquímicos, un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas* 13 (3), 2-6.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Natale, G.S., Pauli, B., Wignall, J., Jackman, P. Doe, K., Schueler, P.M. 2010. Hormonal induction of spawning in 4 species of frogs by coinjection with a gonadotropin-releasing hormone agonist and a dopamine antagonist. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8 (1), 1-36.
- Trumbo, J., Waligora, D., 2009. The impact of the herbicides imazapyr and triclopyr triethylamine on bullfrog tadpoles. *California Fish and Game* 95, 122-127.
- Tuduri, L., Harner, T., Blanchard, P., Li, Y., Poissant, L., Waite, D.T., Murphy, C., Belzer, W., 2006. A review of currently used pesticides (CUPS) in Canadian air and precipitation. Part 2: Regional information and perspectives. *Atmospheric Environment* 40, 1579-1589.
- Turgut, C., 2003. The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Küçük Menderes River in Turkey, 2000–2002. *Environment International* 29, 29-32.
- USEPA, 1974. Compendium of Registered Pesticides, in: Office, U.G.P. (Ed.), Washington, DC.
- USEPA, 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians, in: Agency, U.E.P. (Ed.), USEPA 660/3-75-009,62.
- USEPA, 1989. Imazethapyr Herbicide Profile 3/89, Chemical Fact Sheet for Imazethapyr. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington DC 196.
- USEPA, 2000. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)), in: Environmental Fate and Effects Division, U.S.E. (Ed.), Office of Pesticide Programs. USEPA, Washington, D.C.
- USEPA, 2002a. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms. USEPA 821-R-02-012.

- USEPA, 2002b. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. US Environmental Protection Agency Washington DC.
- Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, F.R., Ingaramo, M.R., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J.N., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, L., Moreno, L., Natale, G., Pérez Iglesias, J.M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C., Zaracho, V., 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26, 131-159.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Van Meter, R.J., Glinski, D.A., Henderson, W.M., Garrison, A.W., Cyterski, M., Purucker, S.T., 2015. Pesticide Uptake Across the Amphibian Dermis Through Soil and Overspray Exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 545-556.
- Van Meter, R.J., Glinski, D.A., Hong, T., Cyterski, M., Henderson, W.M., Purucker, S.T., 2014. Estimating terrestrial amphibian pesticide body burden through dermal exposure. *Environmental Pollution* 193, 262-268.
- van Straalen, N.M., Timmermans, M.J., 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 983-1002.
- Vazquez, M.A., Maturano, E., Etchegoyen, A., Difilippo, F.S., Maclean, B., 2017. Association between Cancer and Environmental Exposure to Glyphosate. *International Journal of Clinical Medicine* 8, 73.
- Venturino, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Cocca, C., Bergoc, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M., 2001a. Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130, 191-198.
- Venturino, A., Gauna, L., Bergoc, R.M., Pechen de D'Angelo, A.M., 2001b. Toxicokinetics of malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel): effect of exogenous spermidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70, 142-150.
- Venturino, A., Montagna, C.M., Pechen de D'Angelo, A.M., 2007. Risk assessment of Magnacide® H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 3: studies on native species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 177-182.
- Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M., 2005. Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* 2, 335-353.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero De Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich De Schroeder, T., Pechen De D'Angelo, A.M., 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8, 167-186.
- Vera Candioti, J., Natale, G.S., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L., 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78, 249-255.
- Vidrine, P.R., Reynolds, D.B., Griffin, J.L., 1993. Weed control in soybean (*Glycine max*) with lactofen plus chlorimuron. *Weed Technology*, 311-316.
- Vitousek, P.M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, G.D., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecological Applications* 1, 1-17.

- Vogiatzis, A.K., Loumbourdis, N.S., 1997. Uptake, tissue distribution, and depuration of cadmium (Cd) in the frog *Rana ridibunda*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 59, 770–776
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561.
- Walker, C.H., 2009. Organic pollutants: an ecotoxicological perspective. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wagner, P.M., Nabholz, J.V., Kent, R.J. 1995. The new chemicals process at the Environmental Protection Agency (EPA): structure–activity relationships for hazard identification and risk assessment. *Toxicology Letters* 79, 67–73
- Wagner, N., Lötters, S., Veith, M., Viertel, B. 2015. Effects of an environmentally relevant temporal application scheme of low herbicide concentrations on larvae of two anuran species. *Chemosphere* 135, 175–181
- Wang, M.Z., Jia, X.Y., 2009. Low levels of lead exposure induce oxidative damage and DNA damage in the testes of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology* 18, 94–99.
- Weisenburger, D.D., 1993. Human health effects of agrichemical use. *Human Pathology* 24, 571–576.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Marine Environmental Research* 69, 71–73
- Williams, B.K., Semlitsch, R.D., 2010. Larval responses of three Midwestern anurans to chronic, low-dose exposures of four herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (3), 819–827.
- Xu, P., Huang, L., 2017. Effects of α -cypermethrin enantiomers on the growth, biochemical parameters and bioaccumulation in *Rana nigromaculata* tadpoles of the anuran amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 431–438.
- Yadav, I.C., Devi, N.L., Syed, J.H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., Jones, K.C., 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *Science of the Total Environment* 511, 123–137.
- Yahnke, A., Grue, C.E., Hayes, M.P., Troiano, A.T., 2013. Effects of the herbicide imazapyr on juvenile Oregon spotted frogs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 228–235.
- Zaya, R.M., Amini, Z., Whitaker, A.S., Kohler, S.L., Ide, C.F., 2011. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 104, 243–253
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*, 5 ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhang, H., Cai, C., Shi, C., Cao, H., Han, Z., Jia, X., 2012. Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog *Rana limnocharis*. *Aquatic Toxicology* 122, 67–74.
- Zhuang, J., Yu, H.Q., Henry, T.B., Sayler, G.S., 2015. Fate and toxic effects of environmental stressors: Environmental control. *Ecotoxicology* 24, 2043–2048.
- Ziegler, L., Berazategui, M., Arim, M., 2013. Discontinuities and alternative scalings in the density–mass relationship of anuran larvae. *Hydrobiologia* 723, 123–129.
- Zoschke, A., 1994. Toward reduced herbicide rates and adapted weed management. *Weed Technology*, 376–386.